



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONIQUE MEYENBERG CUNHA DE PADUA

**MECANISMOS CITOTÓXICOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE  
*Schizolobium amazonicum* E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO EM  
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2) E EFEITO DO  
SILENCIAMENTO DA ENZIMA GLUCOSE – 6 – FOSFATO ISOMERASE (GPI) NA  
SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO  
(LS174T)**

CURITIBA

2017

MONIQUE MEYENBERG CUNHA DE PADUA

**MECANISMOS CITOTÓXICOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE  
*Schizolobium amazonicum* E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO EM  
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2) E EFEITO DO  
SILENCIAMENTO DA ENZIMA GLUCOSE – 6 – FOSFATO ISOMERASE (GPI) NA  
SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO  
(LS174T)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador (a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guilhermina Rodrigues Noleto.

Co – orientador (as): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Maria Suter Correia Cadena

Orientadores no exterior: Dr. Jacques Pouysségur e Dr.<sup>a</sup> Nathalie Mazure (*Université de Nice Sophia – Antipolis*)

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Padua, Monique Meyenberg Cunha de  
Mecanismos citotóxicos da galactomanana de sementes de  
*Schizolobium amazonicum* e seus complexos com oxovanádio em células  
de hepatocarcinoma humano (HepG2) e efeito do silenciamento da enzima  
glucose-6-fosfato isomerase (GPI) na sobrevivência de células de  
adenocarcinoma de cólon humano (LS174T). / Monique Meyenberg  
Cunha de Padua. – Curitiba, 2017.  
159 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Guilhermina Rodrigues Noleto  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Carcinoma Hepatocelular 2. Adenocarcinoma 3. Metabolismo I.  
Título II. Noleto, Guilhermina Rodrigues III. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica.

CDD (20. ed.) 614.5999



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MONIQUE MEYENBERG CUNHA DE PADUA** intitulada: **Mecanismos citotóxicos da galactomanana de sementes de *Schizolobium amazonicum* e seus complexos com oxovanádio em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e efeito do silenciamento da enzima glucose – 6 – fosfato isomerase (GPI) na sobrevivência de células de adenocarcinoma de cólon humano (LS174T)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **aprovação** no rito da defesa.

A outorga do título de Doutor está sujeita a homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós – graduação.

Curitiba, 7 de julho de 2017.



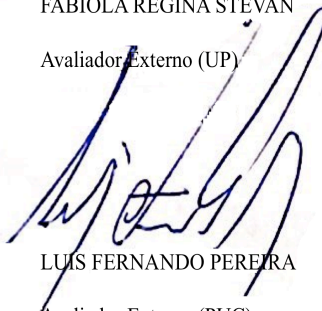
GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



FABIOLA REGINA STEVAN

Avaliador Externo (UP)



LUIS FERNANDO PEREIRA

Avaliador Externo (PUC)



GLAUCIA REGINA MARTINEZ

Avaliador Interno (UFPR)



MARIA ELIANE MERLIN ROCHA

Avaliador Interno (UFPR)



Dedico essa tese ao meu AMOR Gustavo e a minha filha Isabella;  
aos meus exemplos de vida, meus HERÓIS, meus amados pais Inara e José;  
aos que chamo de “minha metade” meus irmãos, Priscila e Emanuel;  
e a Melissa e Miguel, por tornarem nossas vidas mais alegres.

## AGRADECIMENTOS

Às vezes nos faltam palavras e atitudes para agradecer aqueles que estão em nosso cotidiano, na nossa rotina, ou aqueles que vimos poucos, mas que possuíram um papel fundamental nessa jornada. Porém, jamais me esquecerei de agradecer a Deus, por ter me dado forças, pois só Ele conhece meu coração e sabia de todos os meus medos e anseios. Obrigada Deus por permitir que jamais desistisse.

A família linda que formei durante esse período: à minha filha Isabella, que ainda está na minha barriga, sentiu tudo o que a mamãe sentia; e ao meu esposo Gustavo, que sempre me apoiou, me entendeu e me segurou naqueles dias mais difíceis em que pensei em desistir. EU TE AMO. Obrigada por estar ao meu lado nesses nove anos.

Aqueles que são responsáveis por eu estar aqui, mãe e pai, mais uma vez não têm palavras para agradecer. Obrigada por todo o apoio e amor incondicional, sem medirem esforços em nos ajudar e sempre estarem dispostos para tudo. Esta conquista, também, é de vocês! Espero um dia poder retornar tudo o que vocês fizeram e fazem pela minha família.

Aos meus irmãos, Priscila e Emanuel, que são meus exemplos e sempre me apoiaram em todas as escolhas que eu fiz e por me darem coragem e amor. Nunca me esqueço de quando éramos crianças e vocês iam me buscar no jardim de infância. Obrigada por sempre me protegerem.

Ao meu amado “vô” Cunha *in memoriam* que sempre foi meu exemplo de ser humano, profissional, pai, esposo e avô mais querido desse MUNDO.

As minhas avós, Cecília e Leonilda, que ajudaram na minha criação e nos momentos em que mais precisei elas estavam lá para me dar aquele colo especial.

A minha estimada Orientadora, Professora Doutora Guilhermina Rodrigues Noleto, pelos momentos de dedicação, aprendizagem e motivação. Por ter acreditado em mim e ter me aceitado durante o mestrado e doutorado. Esses seis anos juntas, aprendi muito contigo e sou grata a Deus por ter colocado você em meu caminho!

As minhas coorientadoras, Professoras Doutora Carmen Petkowicz e Doutora Silvia Cadena, pelo incentivo e ajuda. Obrigada, também, pela ajuda nas correções dos trabalhos!

As minhas queridas e amadas amigas de infância, Thayne, Carla, Renata e Rafaella, por todos esses anos de amizade, de amor e carinho. Sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

A minha amiga Juliana Kenski, que só tenho a agradecer pela grande amiga que você se tornou nesses seis anos de caminhada entre Mestrado e Doutorado. Por ter me ajudado nos momentos de angústia, enquanto estava na França, que por sinal graças a Ti consegui realizar o estágio naquela linda cidade, *Nice très belle!* Assim como ter me mostrado que eu era capaz. Amo-te Amiga!

As amigas Lyvia Petiz e Maria Carolina Pellosi, sem estarmos juntas nessa jornada, vocês foram mais que essenciais para mim! Senti e sinto muito a falta de vocês.

Ao Gustavo Jabor Gozzi, Amigo querido e colega de profissão, pelo incentivo, ajuda em tudo que eu precisei e também pelo companheirismo nessa empreitada louca, que é fazer um doutorado.

Ao Arquimedes, que além de fazer as análises de RMN, sempre nos ajudou em tudo que podia, desde a manutenção de equipamentos até na hora de facilitar na entrada do laboratório, em função da indisponibilidade das chaves. Pelas conversas nos corredores da Bioquímica e sempre me mostrar que nem tudo é tão ruim quanto parece ser.

Ao Gláucio Valdameri, que foi essencial nas análises do potencial transmembrana mitocondrial, além de ajudar com o equipamento de citometria de fluxo.

A Andreia Akemi Suzukawa do Instituto Carlos Chagas (Fio Cruz – Paraná) por ter cedido seu tempo na ajuda da utilização do equipamento de luminescência para realizar os experimentos de ATP.

As Professoras do laboratório de oxidações biológicas, em especial as professoras Doutora Glaucia e Doutora Maria Eliane, que além de me ajudarem muito com palavras de apoio e serem importantes em tirar as minhas dúvidas, foram essenciais nas correções dos relatórios e a tese! Muito obrigada.

Aos meus Colegas e Amigos do laboratório de oxidações biológicas, deixando de citar alguns nomes, pois afinal foram seis anos, os quais eu pude conhecer e aprender com muitos de vocês, porém gostaria de agradecer em especial os amigos do “três”: Thiago Jacomasso, Will, Felipe, Paloma e Pati; pessoal do “dois”: Fernanda Guterres, Carol, Rafa, Juliana Bark, Otávio, Carina Scoparo e Lucas. E, que o principal de tudo, é que nunca devemos desistir, pois no final tudo valeu a pena!

Aos amigos e vizinhos de bancada do “um”: Juan, Amanda, Carlos, Anna Paula e Diego, por todas as conversas, risadas, trocas de protocolo, ajuda nos experimentos. Muito obrigada pessoal: vocês são e serão sempre especiais na minha vida!

As amigas queridas que fiz durante o doutorado, a Aninha, Elaine e Stephane, que nas horas em que mais precisei sempre tinham aquelas palavras de apoio, amor, carinho e incentivo, pelas pausas no meio da tarde para colocarmos nosso papo em dia. Obrigada gurias, vocês sempre serão essenciais, seja na minha vida acadêmica ou pessoal.

As técnicas Eliz e Rosângela pelas análises de GLC e HPSEC.

Aos Colegas e Amigos do laboratório de química de carboidratos vegetais, em especial, a Marília, Cristiane e Lúcia, por toda ajuda com os experimentos!

A professora Doutora Ana Lucia Ramalho Mercê do Departamento de Química dessa Universidade, pela ajuda nos experimentos com a complexação com o vanádio.

A professora Doutora Fabíola Stevan, um agradecimento mais que especial, pois Ela é a minha maior incentivadora por ter me tornado o que sou hoje profissionalmente. Minha Mãe Científica, que me introduziu a esse universo maravilhoso chamado BIOQUÍMICA, muito obrigada!

Aos técnicos do laboratório de FT-IR do Departamento de Química (UFPR) pela ajuda nos experimentos de espectrometria de infravermelho.

A Pós-graduação em Ciências – Bioquímica pela oportunidade e por toda a ajuda, principalmente, na parte burocrática.

Aos meus “mentores franceses” Jacques Pouysségur e Nathalie Mazure, que durante um ano na França, me ajudaram em tudo o que precisei, acreditaram no meu trabalho e, também, foram essenciais em meu aprendizado. *Je vous remercie pour tous ce que vous avez fait pour moi!* Sou muito grata por ter tido vocês em meu caminho e por terem me mostrado que eu sou capaz!

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Nice (*Tumour Hypoxia & Cancer Metabolism*) e Mônaco (*Hypoxie tumorale et métabolisme*), em especial a Maša, Milica, Sandy, Pape, Ibtissam, Blanca, Julien e Yann que além de me ajudarem nos experimentos, foram essenciais na minha convivência sozinha em outro país. *Merci beaucoup mes amis. Je ne vais jamais oublier tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous kiffe tous!*

Ao site [www.somersault1824.com](http://www.somersault1824.com) pelo fornecimento das ilustrações para a criação da maioria dos esquemas apresentados nas seções de revisão bibliográfica e discussão final deste trabalho.

E por fim, porém não menos importante, as agências financiadoras, CAPES e CNPq pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche; e INCT-Redoxoma pelo auxílio financeiro.



*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo”. (Winston Churchill)*

*“It would be possible to illustrate the entire history of biochemistry... with the work of Otto Warburg.” (Adolf F. J. Butenandt, 1970)*

## RESUMO

Nesse estudo, foi avaliada a toxicidade de preparações de galactomananas isoladas de sementes de *Schizolobium amazonicum* e de seus complexos com oxovanádio em células HepG2, com enfoque nos efeitos sobre o metabolismo energético. A galactomanana nativa (SAGM) foi obtida do endosperma das sementes de *S. amazonicum* por extração aquosa a 25 °C. O polímero nativo foi submetido à hidrólise ácida parcial resultando na fração MSAGM. A comparação dos perfis de eluição por HPSEC/MALLS/RI das galactomananas nativa e modificada confirmou a hidrólise parcial. A massa molecular de MSAGM obtida por MALLS foi de  $1,56 \times 10^4$  g/mol. A razão Man:Gal de 3,2:1, determinada por GC, não foi alterada em relação a galactomanana nativa. SAGM e MSAGM foram complexadas com oxovanádio, sendo denominadas SAGM:VO e MSAGM:VO, respectivamente. A complexação dos biopolímeros com oxovanádio (IV/V) foi caracterizada por titulação potenciométrica, FT-IR, RMN  $^{51}\text{V}$  e  $^{13}\text{C}$ . A técnica de absorção atômica foi utilizada para determinar a presença do metal nos complexos. Os valores das constantes de complexação para os equilíbrios químicos foram similares para ambas as preparações, exceto para o equilíbrio  $[\text{L}_2(\text{OH})_2(\text{VO})_2]/[\text{L}]^2 \cdot [\text{OH}]^2 \cdot [\text{VO}]^2$  que foi detectado apenas para MSAGM:VO. Para o complexo SAGM:VO o conteúdo de vanádio foi 3,8 vezes maior ao do complexo MSAGM:VO. Dentre os polímeros, SAGM e MSAGM:VO promoveram maior redução (~50%) na viabilidade das células HepG2 na concentração de 250 µg/mL durante 72h de incubação. Nas mesmas condições somente MSAGM:VO (250 µg/mL) promoveu inibição de ~50% na proliferação destas células. Ambos os polímeros também inibiram todos os estados da respiração (basal: ~70%; desacoplado: ~80%, e leak: ~40%). Este efeito se repetiu também em células permeabilizadas, nas quais foi observada a inibição da respiração em ~50%, que se manteve após a adição de ADP, glutamato/malato e succinato, estes últimos substratos para os complexos I e II, respectivamente. A concentração de lactato das células HepG2 incubadas com SAGM (250 µg/mL) por 72h aumentou em ~25%, porém para SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO (250 µg/mL) houve redução de ~20%. Nas mesmas condições, a presença dos biopolímeros não alterou significativamente a concentração de piruvato. Os níveis de ATP foram reduzidos em ~30% após o tratamento de 72h com 250 µg/mL com todas as preparações. MSAGM:VO aumentou os níveis de ROS em ~149%, enquanto o potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) foi reduzido em ~47%. A análise da morte celular em condição de normóxia, após 72 h, mostrou que MSAGM:VO (250 µg/mL) promoveu o aumento da atividade de caspases (3 e 7) envolvidas na morte celular por apoptose e, em menor intensidade, a proteína pro-apoptótica BAX. Porém, em condições de hipóxia, o biopolímero aumentou a expressão das proteínas anti-apoptóticas MCL-1 e BCL-XL. Também nesta condição (hipóxia), o tratamento com MSAGM:VO promoveu aumento das proteínas LC3-II e redução de p62, sugerindo o processo de autofagia. Os níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$  em condições de hipóxia foram reduzidos após o tratamento com MSAGM:VO (250 µg/mL e 72h). Esses resultados demonstram que as preparações das galactomananas de *S. amazonicum*, especialmente, SAGM e MSAGM:VO, tornam as células HepG2 suscetíveis a morte e sugerem que estes polímeros tem potencial atividade antitumoral, motivando estudos futuros que viabilizem sua aplicação terapêutica.

Além do estudo realizado com as galactomananas de *S. amazonicum*, o outro objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do silenciamento da enzima glucose – 6 – fosfato isomerase (GPI) em células LS174T. GPI é uma enzima citosólica que realiza a interconversão de glucose – 6 – fosfato em frutose – 6 – fosfato. A interrupção genética desta enzima em células LS174T (GPIKO) foi realizada de forma a desviar o metabolismo dessas células para a via das pentoses fosfato. Após o silenciamento de GPI, em condições de normóxia, foi observado

uma redução de glucose e lactato, reprogramando as células GPIKO para a fosforilação oxidativa de forma a elevar os níveis de ATP mitocondrial, mantendo assim a viabilidade. A incubação com fenformina nas células GPIKO, levaram as células a morte, indicando sensibilidade ao inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Em condições de hipóxia, GPIKO teve seu crescimento celular reduzido, caracterizado pela diminuição da proliferação e respiração celular. Apesar da restrição do crescimento *in vitro* sob hipóxia, o crescimento tumoral *in vivo* reduziu moderadamente em comparação ao tipo selvagem, o qual não apresentava a mutação. Esses resultados indicam que a utilização exclusiva do metabolismo oxidativo tem a capacidade de fornecer precursores metabólicos para o crescimento tumoral, apontando a plasticidade do metabolismo das células tumorais apresentarem uma forte limitação para estratégias antitumorais.

Palavras – chave: galactomananas; oxovanadio (IV/V); células HepG2; células LS174T; GPI; metabolismo; efeitos citotóxicos; antitumoral; hipóxia.



## ABSTRACT

The aim of this study, was evaluated the toxicity of galactomannan preparations isolated from seeds of *S. amazonicum* and its complexes with oxovanadium in HepG2 cells, focusing on effects of energy metabolism. Native galactomannan (SAGM) was obtained from endosperm of *S. amazonicum* seeds by aqueous extraction at 25 °C. SAGM was subjected to partial acid hydrolysis resulting in the MSAGM fraction. HPSEC/MALLS/RI elution profiles of native and modified galactomannans confirmed partial hydrolysis. Molecular mass of MSAGM obtained by MALLS was  $1.56 \times 10^4$  g/mol. The Man: Gal ratio of 3.2:1 determined by GC, was not modified in relation to SAGM. SAGM and its partially hydrolyzed form (MSAGM) were complexed with oxovanadium, and was called SAGM:VO and MSAGM:VO, respectively. The complexation of biopolymers with oxovanadium (IV/ V) was characterized by potentiometric titration, FT-IR, NMR  $^{51}\text{V}$ ,  $^{13}\text{C}$ . Atomic absorption technique was used to determine the presence of the metal in the complexes. The values of the complexation constants for the chemical equilibria were similar for both preparations, except for the equilibrium  $[\text{L}_2(\text{OH})_2(\text{VO})_2]/[\text{L}]^2 \cdot [\text{OH}]^2 \cdot [\text{VO}]^2$  that was detected only for MSAGM:VO. For SAGM:VO complex the vanadium content was 3.8 fold greater than MSAGM:VO complex. Among the polymers, SAGM and MSAGM:VO promoted a greater reduction (~ 50%) in the viability of HepG2 cells at concentration of 250 µg/mL during 72h of incubation. Under the same conditions only MSAGM:VO promoted ~ 50% of inhibition in the proliferation of these cells. Both polymers also inhibited all states of respiration (basal: ~ 70%, decoupled: ~ 80%, and leak: ~ 40%). This effect was also repeated in permeabilized cells, in which respiration inhibition was observed in ~ 50%, which was maintained after the addition of ADP, glutamate/malate and succinate (substrates for complexes I and II, respectively). Lactate concentration of HepG2 cells incubated with SAGM (250 µg/mL) for 72h increased by ~ 25%, but for SAGM:VO, MSAGM and MSAGM:VO, there was a ~ 20% reduction. Under the same conditions, the presence of the biopolymers did not significantly alter the concentration of pyruvate. ATP levels were reduced by ~ 30% after treatment of 72 h at 250 µg/ml with all preparations. MSAGM:VO increased ROS levels by ~ 149%, while mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) was reduced by ~ 47%. The analysis of cell death in normoxic condition, after 72h, showed that MSAGM:VO (250 µg / mL) promoted an increase of caspase activity (3 and 7) and, to a lesser extent, protein BAX. However, under hypoxia conditions, the biopolymer increased expression of the anti-apoptotic proteins MCL-1 and BCL-XL. Also in this condition, treatment with MSAGM:VO promoted increase of LC3-II proteins and reduction of p62, suggesting the autophagy process. Expression levels of HIF-1 $\alpha$  under hypoxia conditions were reduced after treatment with MSAGM:VO (250 µg/mL and 72 h). These results demonstrate that the preparations of galactomannans from *S. amazonicum*, especially SAGM and MSAGM:VO, render HepG2 cells susceptible to death and suggest that these polymers have a potential antitumor activity, motivating future studies that allow their therapeutic application.

In addition to the study carried out with galactomannans from *S. amazonicum*, the other aim of this study was to evaluate the impact of disruption glucose - 6 - phosphate isomerase (GPI) on LS174T cells. GPI is a cytosolic enzyme that performs glucose - 6 - phosphate interconversion to fructose - 6 - phosphate. Genetic disruption of this enzyme in LS174T cells (GPIKO) was performed in a way to divert the metabolism of these cells to the phosphate pentose pathway. After GPI silencing under conditions of normoxia, a reduction of glucose and lactate was observed, reprogramming GPIKO cells for oxidative phosphorylation in order to raise mitochondrial ATP levels, thus maintaining viability. Incubation with phenformin in GPIKO cells led the cells to death, indicating sensitivity to the inhibitor of the complex I of the electron transport chain. Under hypoxia conditions, GPIKO had a reduced

cell growth, characterized by decreased proliferation and cellular respiration. Despite *in vitro* growth restriction under hypoxia, tumor growth *in vivo* moderately reduced compared to wild type, which did not show the mutation. These results indicate that the exclusive use of oxidative metabolism has the ability to provide metabolic precursors for tumor growth, pointing out that the plasticity of tumor cell metabolism has a strong limitation for antitumor strategies.

Key - words: galactomannan; Oxovanadium (IV/V); HepG2 cells; LS174T cells; metabolism; GPI; Cytotoxic effects; Antitumor; Hypoxia.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CAPACIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS TUMORAIS.....	26
FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DA FISIOLÓGIA DAS CÉLULAS TUMORAIS .....	27
FIGURA 3- EFEITO WARBURG, PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS NORMAIS E CÉLULAS TUMORAIS .....	29
FIGURA 4 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA GLICOLÍTICA E VIA DAS PENTOSE FOSFATO .....	32
FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS DE CÉLULAS TUMORAIS.....	35
FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTABILIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE HIF-1 EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA EM CÉLULAS TUMORAIS.	36
FIGURA 7 - ALVOS METABÓLICOS NA TERAPIA DO CÂNCER .....	38
FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA MITOCÔNDRIA E SUAS DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	41
FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTANDO AS VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DA APOPTOSE.....	43
FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTANDO O PROCESSO AUTOFÁGICO .....	45
FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES PARA A DESTRUIÇÃO DE PATÓGENOS POR POLISSACARÍDEOS MRB .....	47
FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA INTERAÇÃO DO RECEPTOR ASGPR COM COMPOSTOS CONTENDO GALACTOSE E MANOSE.....	49
FIGURA 13 - ESTRUTURA DE UMA GALACTOMANANA DE RAZÃO DE 3:1 (MANOSE: GALACTOSE) .....	50
FIGURA 14 – EFEITOS ANTITUMORAIS OBSERVADOS POR COMPOSTOS COM VANÁDIO .....	55
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DAS GALACTOMANANAS (SAGM E MSAGM) OBTIDAS DAS SEMENTES DE <i>S. amazonicum</i> .....	76
FIGURA 16 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO SOMENTE O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) DAS FRAÇÕES SAGM E MSAGM.....	77
FIGURA 17 - PERFIL DO POTENCIAL TITULOMÉTRICO DAS GALACTOMANANAS NATIVA (SAGM) E PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM).....	78



FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN $^{51}\text{V}$ DAS GALACTOMANANAS NATIVA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO) E NA SUA FORMA PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM:VO) .....	81
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DE SEMENTES DE <i>S. amazonicum</i> (SAGM) E NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO) .....	82
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ DAS GALACTOMANANAS PARCIALMENTE HIDROLISADA DE <i>S. amazonicum</i> (MSAGM) E NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO) .....	83
FIGURA 21 – ESPECTRO DE FTIR DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DE SEMENTES DE <i>S. amazonicum</i> (SAGM), NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO), PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM) E PARCIALMENTE HIDROLISADA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO) .....	85
FIGURA 22 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG2. ....	89
FIGURA 23 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2 .....	90
FIGURA 24 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2 INTACTAS.....	96
FIGURA 25 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2 PERMEABILIZADAS. ....	99
FIGURA 26 - NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS .....	102
FIGURA 27 - NÍVEIS DE ATP DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS .....	103
FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ) DAS CÉLULAS HepG2 INCUBADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS .....	106
FIGURA 29 – NÍVEIS DE ROS DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS E VIABILIDADE CELULAR APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC.....	108
FIGURA 30 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS HepG2 APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA ..	110
FIGURA 31 - ATIVIDADE DAS CASPASES 3 E 7 DAS CÉLULAS HepG2 APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA ..	111

FIGURA 32 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PRO E ANTI APOPTÓTICAS DE CÉLULAS HepG2 APÓS O TRATAMENTO COM MSAGM:VO .....	113
FIGURA 33 – VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DO NÚCLEO DAS CÉLULAS HepG2 INCUBADAS COM MSAGM:VO APÓS COLORAÇÃO COM DAPI .....	115
FIGURA 34 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE HIF-1 $\alpha$ E TUBULINA APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	116
FIGURA 35 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE p62, LC3-I, LC3-II E TUBULINA APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA ..	118
FIGURA 36 - ANÁLISE POR WESTERN BLOT DA CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA ENZIMA GPI EM CÉLULAS LS174T .....	120
FIGURA 37 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1 E TXNIP EM CÉLULAS LS174T NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLUCOSE .....	121
FIGURA 38 – PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	122
FIGURA 39 – ENSAIO REPRESENTATIVO CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	123
FIGURA 40 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA .....	123
FIGURA 41 – MONITORAMENTO DA TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA .....	124
FIGURA 42 - MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE LACTATO EXTRACELULAR DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	125
FIGURA 43 - NÍVEIS DE ATP DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE FENFORMINA (Phen) .....	126
FIGURA 44 - ENSAIO CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA NA PRESENÇA E/OU AUSÊNCIA DE FENFORMINA (Phen) .....	126
FIGURA 45 – EFEITO DA FENFORMINA (Phen) NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	127
FIGURA 46 - MONITORAMENTO DA CAPACIDADE RESPIRATÓRIA (OCR) DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.....	128

FIGURA 47 – INIBIÇÃO DA ENZIMA GPI COMBINADA COM A PRESENÇA DE FENFORMINA EM MODELOS XENOGRÁFICOS.....	129
FIGURA 48 - POSSÍVEIS MECANISMOS CITOTÓXICOS INDUZIDOS PELAS PREPARAÇÕES DE GALACTOMANANAS SAGM E MSAGM:VO .....	133
FIGURA 49 - POSSÍVEIS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA EM CÉLULAS LS174T <i>KO</i> EM GPI.....	135

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONSTANTES DE COMPLEXAÇÃO CALCULADAS PARA OS COMPLEXOS SAGM:VO E MSAGM:VO.....	79
TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS AVALIADOS .....	104

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>25</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>26</b>
4.1 CÂNCER.....	26
4.1.1 Aspectos gerais do câncer.....	26
4.2 METABOLISMO DO CÂNCER.....	28
4.2.1 Efeito Warburg .....	28
4.2.2 Via das pentoses fosfato .....	31
4.2.3 Microambiente tumoral e <i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i> (HIF-1 $\alpha$ ) .....	33
4.3 ALGUNS ALVOS METABÓLICOS NA TERAPIA DO CÂNCER .....	37
4.3.1 Metabolismo glicolítico e reprogramação metabólica mitocondrial .....	37
4.3.2 Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) .....	39
4.4 MORTE CELULAR.....	42
4.4.1 Apoptose .....	42
4.4.2 Autofagia .....	44
4.5 AÇÃO ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS.....	46
4.5.1 Galactomananas e suas aplicações biológicas .....	50
4.6 VANÁDIO E SUA APLICAÇÃO BIOLÓGICA .....	52
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
5.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	58
5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA PARCIALMENTE HIDROLISADA.....	58
5.2.1 Determinação da homogeneidade e massa molar por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detecção por espalhamento de laser multiângulos e índice de refração (HPSEC – MALLS-RI). .....	59
5.2.2 Determinação da composição monossacarídica .....	59
5.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	60
5.3.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C).....	60
5.3.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de vanádio 51 (RMN <sup>51</sup> V).....	60
5.3.3 Análise por espectrometria de infravermelho (FT-IR- <i>Fourier Transform – Infrared</i> ).....	61
5.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DAS GALACTOMANANAS COM OXOVANÁDIO (IV/V) .....	61
5.4.1 Titulação potenciométrica.....	61
5.5 CULTIVO CELULAR .....	62

5.5.1 Modelos celulares .....	62
5.5.2 Meios de cultura para as células HepG2 e LS174T .....	63
5.5.3 Solução de tripsina-EDTA .....	63
5.5.4 Solução salina fosfato tamponada (PBS) .....	63
5.5.5 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS) .....	64
5.5.6 Preparação das soluções das galactomananas para uso nos ensaios de atividade biológica .....	64
<b>5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NAS CÉLULAS HEPG2</b> .....	<b>64</b>
5.6.1 Determinação da viabilidade celular .....	64
5.6.2 Determinação da proliferação celular .....	65
5.6.3 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) .....	65
5.6.4 Determinação da viabilidade celular na presença de <i>N</i> - acetilcisteína (NAC) .....	66
5.6.5 Determinação dos níveis de ATP .....	66
5.6.6 Avaliação da respiração em células HepG2 intactas .....	67
5.6.7 Avaliação da respiração em células HepG2 permeabilizadas .....	67
5.6.8 Determinação dos níveis de lactato e piruvato .....	68
5.6.9 Medida do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	69
5.6.10 Determinação da viabilidade celular em condições de normóxia e hipóxia .....	69
5.6.11 Avaliação da atividade das caspases 3 e 7 em condições de normóxia e hipóxia .....	70
5.6.12 Avaliação da morfologia das células HepG2 em condições de normóxia e hipóxia por coloração DAPI .....	70
5.6.13 Determinação dos níveis de expressão das proteínas BCL-2, BCL-XL, MCL-1, HIF-1 $\alpha$ , LC3-I, LC3-II, p62, GPI, GLUT-1, TXNIP, tubulina e ARD-1 por western blot .....	70
<b>5.7 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS LS174T APÓS SILENCIAMENTO DA ENZIMA GPI</b> .....	<b>71</b>
5.7.1 Silenciamento da enzima GPI nas células LS174T mediado pelo sistema CRISPR/cas9 .....	71
5.7.2 Ensaio clonogênico .....	71
5.7.3 Análise de parâmetros metabólicos .....	72
5.7.4 Avaliação da proliferação das células LS174T .....	72
5.7.5 Determinação dos níveis de ATP intracelular das células LS174T em condições de normóxia e hipóxia .....	72
5.7.6 Viabilidade das células LS174T em condições de normóxia após tratamento com fenformina .....	73
5.7.7 Determinação dos níveis de lactato extracelular em condições de normóxia e hipóxia .....	73
5.7.8 Avaliação do silenciamento da enzima GPI em modelos xenográficos .....	74
<b>5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>74</b>

<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GALACTOMANANAS E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO (IV/V).....	75
6.2 TOXICIDADE DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS EM CÉLULAS HEPG2.....	87
6.2.1 Efeitos sobre a viabilidade e proliferação.....	87
6.2.2 Efeitos em alguns parâmetros do metabolismo celular.....	92
6.2.2.1 Respiração – células intactas .....	92
6.2.2.2 Respiração – células permeabilizadas.....	97
6.2.3 Efeitos no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	104
6.2.4 Efeitos nos níveis de ROS intracelulares .....	106
6.3 EFEITOS DA GALACTOMANANA PARCIALMENTE HIDROLISADA E COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO) NAS CÉLULAS HEPG2 EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA .....	109
6.3.1 Proliferação celular.....	109
6.3.2 Atividade das caspases 3 e 7.....	110
6.3.3 Expressão de proteínas pro e anti-apoptóticas .....	112
6.3.4 Morfologia .....	114
6.3.5 Possíveis mecanismos de resistência .....	115
6.4 SILENCIAMENTO DA GLUCOSE – 6 – FOSFATO ISOMERASE (GPI) PELO SISTEMA CRISPR-CAS9 EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (LS174T) .....	119
6.4.1 Proliferação das células LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia e hipóxia .....	121
6.4.2 Avaliação do metabolismo das células LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia e hipóxia .....	123
6.4.3 Avaliação do silenciamento da enzima GPI em camundongos nude .....	128
<b>7. DISCUSSÃO FINAL .....</b>	<b>130</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>160</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um dos tumores mais agressivos e é considerado a terceira causa mais comum de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (BUENDIA; NEUVEUT, 2015; FORNER *et al.*, 2016). Os fatores de risco para esse tipo de câncer incluem: o uso abusivo do tabaco e álcool, infecções pelos vírus da hepatite B e C associadas a doenças crônicas do fígado (como a cirrose), e obesidade (FATTOVICH *et al.*, 2004; MARRERO *et al.*, 2005; DYSON *et al.*, 2014; EL-SERAG *et al.*, 2016). Embora muitos esforços tenham sido realizados no sentido de prolongar a vida dos pacientes com CHC, os tratamentos causam uma série de efeitos colaterais (ZHANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014). Além disso, as células tumorais em geral, adquirem resistência a certos quimioterápicos, comumente associados ao padrão metabólico particular destas células. Assim, a busca por novos compostos que tem como alvo o metabolismo destas células têm se intensificado (FULDA *et al.*, 2010; TENNANT *et al.*, 2010; PARKS *et al.*, 2013a; MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016; SPUGNINI; FAIS, 2017).

Dentre os compostos com potencial terapêutico para o tratamento do CHC, destacam-se os polissacarídeos. Para estes produtos naturais bioativos, têm sido atribuídos diversos efeitos biológicos, entre estes a atividade antitumoral (ZONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015a; FAN *et al.*, 2017). Em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), por exemplo, alguns polissacarídeos foram capazes de induzir a morte celular por apoptose pela via intrínseca mitocondrial (SHEN *et al.*, 2016). A atividade antitumoral destes polímeros pode, ainda, ser intensificada pela modificação química, incluindo a hidrólise ácida parcial, bem como introdução de íons metálicos, como o vanádio (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009).

Tem sido proposto, que a complexação de metais com ligantes orgânicos melhora a sua biodistribuição, diminui sua toxicidade para com o hospedeiro e potencializa seus efeitos biológicos em diversos modelos de estudo (GYURCSIK; NAGY, 2000; SIBIKINA *et al.*, 2009; WILLSKY *et al.*, 2013; KREMER *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015b). O vanádio é um metal de transição considerado essencial em baixas concentrações para algumas espécies (EVANGELOU, 2002; REHDER, 2016; REHDER, 2017), sendo que, os estados de oxidação classificados como os mais importantes do ponto de vista biológico são o estado IV (vanadil) e V (vanadato) (EVANGELOU, 2002; BISHAYEE *et al.*, 2010). Para ligantes orgânicos complexados com vanádio, nos quais os estados de oxidação do metal podem variar, foram descritas atividades citotóxica e de supressão tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, levando a morte celular por apoptose associada à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

(ABAKUMOVA *et al.*, 2012; KIOSEOGLOU *et al.*, 2015). Estudos realizados com polissacarídeos complexados com oxovanádio, também vêm sendo realizados, neste caso, galactomananas isoladas de sementes de *Mimosa scabrella* e do líquen *Ramalina celastri* e seus complexos com oxovanádio apresentaram efeitos imunomoduladores, envolvidos na ativação de macrófagos (ADRIAZOLA *et al.*, 2014). Além dos efeitos observados em relação à ativação de macrófagos, as galactomananas complexadas com oxovanádio, apresentaram também atividade leishmanicida (ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015) e efeitos citotóxicos em células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009).

É sabido que as células HepG2 possuem receptores de membrana conhecidos como asialoglicoproteínas (ASGP-R) os quais reconhecem unidades de *N*-acetilglicosamina, manose e/ou galactose (LAI *et al.*, 2010), sabendo disto e somando-se ao fato de que a galactomanana de *S. amazonicum* inibiu a respiração de células HepG2 (CUNHA - DE PADUA *et al.*, 2017), efeito possivelmente associado à sua toxicidade nestas células, no presente trabalho, também foram investigados os efeitos das galactomananas sobre alguns parâmetros do metabolismo das células de hepatocarcinoma. Além disso, foram avaliados os possíveis mecanismos de morte das células HepG2 quando tratadas com galactomananas parcialmente hidrolisadas e complexadas com oxovanádio em condições de hipóxia (1 % de oxigênio). Esta condição foi incluída, uma vez que, em baixas concentrações de oxigênio, certos compostos anticâncer promovem efeitos diferentes aos observados em condições normais (20 % de oxigênio), sendo que algumas células tumorais apresentam certa resistência a diversos quimioterápicos em condições de hipóxia (CHICHE *et al.*, 2009; BRAHIMI-HORN *et al.*, 2012; GAO; CHEN, 2015).

Considerando a importância do metabolismo glicolítico das células tumorais, ainda neste trabalho, foram investigados os mecanismos de sobrevivência de células de adenocarcinoma de cólon humano (LS174T) após o silenciamento da enzima glucose – 6 – fosfato isomerase (GPI). A GPI é a segunda enzima da via glicolítica que é responsável em catalisar a conversão da glucose – 6 – fosfato em frutose – 6 – fosfato. Além de catalisar tal reação, em células tumorais a GPI pode agir como anti apoptótica pela diminuição na regulação de genes como Apaf-1 e caspase 9, que indiretamente regulam a formação do apoptossomo (DAS *et al.*, 2016; YU; LI, 2017). Alguns estudos indicam que a superexpressão da enzima GPI contribui para um fenótipo agressivo de células tumorais de cólon humano, podendo ser um novo alvo terapêutico. Neste sentido, o silenciamento da enzima GPI em células tumorais pode alterar o metabolismo da glucose influenciando algumas vias

metabólicas, como por exemplo, a via das pentoses fosfato (VFP) (DAS *et al.*, 2016; DE PRETER *et al.*, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora existam tratamentos para o CHC, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que são considerados eficazes somente em estágios iniciais do tumor. Em tumores em estágio avançado e/ou metastático a quimioterapia é utilizada apenas como tratamento paliativo e apresenta diversos efeitos colaterais, os quais estão relacionados a não seletividade das células tumorais e células normais. Sendo assim, a procura por novos tratamentos que melhorem a sobrevida dos pacientes e que sejam mais eficientes para esse tipo de câncer tem sido crescente.

Considerando o descrito em relação à necessidade de obtenção de novas terapias para o CHC, os efeitos citotóxicos observados para galactomananas nativas e quimicamente modificadas e seus complexos com oxovanádio e a facilidade de obtenção destes biopolímeros, torna-se relevante o estudo dos mecanismos envolvidos na atividade citotóxica destes complexos. Sendo assim, este estudo teve como objetivo geral, avaliar os mecanismos relacionados à citotoxicidade da galactomanana de *S. amazonicum* nativa e parcialmente hidrolisada, bem como de seus complexos com oxovanádio (IV/V) em células HepG2.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1) Isolar, caracterizar, hidrolisar parcialmente, complexar as preparações nativa e hidrolisadas da galactomanana com o oxovanádio;
- 2) Avaliar os efeitos das preparações das galactomananas sobre a viabilidade, a respiração, a produção de lactato e piruvato, parâmetros de estresse oxidativo, os níveis de ATP e o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em células HepG2 íntegras,;
- 3) Avaliar os efeitos das preparações das galactomananas sobre a respiração na presença de diferentes substratos da cadeia de transporte de elétrons em células HepG2 permeabilizadas;
- 4) Avaliar os efeitos das preparações da galactomanana parcialmente hidrolisada e seu complexo com oxovanádio nas células HepG2 cultivadas em condições de normóxia (20%) e hipóxia (1%) em relação a parâmetros relacionados:
  - A morte celular:
    - Atividade das caspases 3 e 7;
    - Proliferação celular e viabilidade celular;
    - Níveis de expressão das proteínas pro (BAX) e anti-apoptóticas (BAK e MCL-1);

- Aos níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$ ;
- A autofagia.

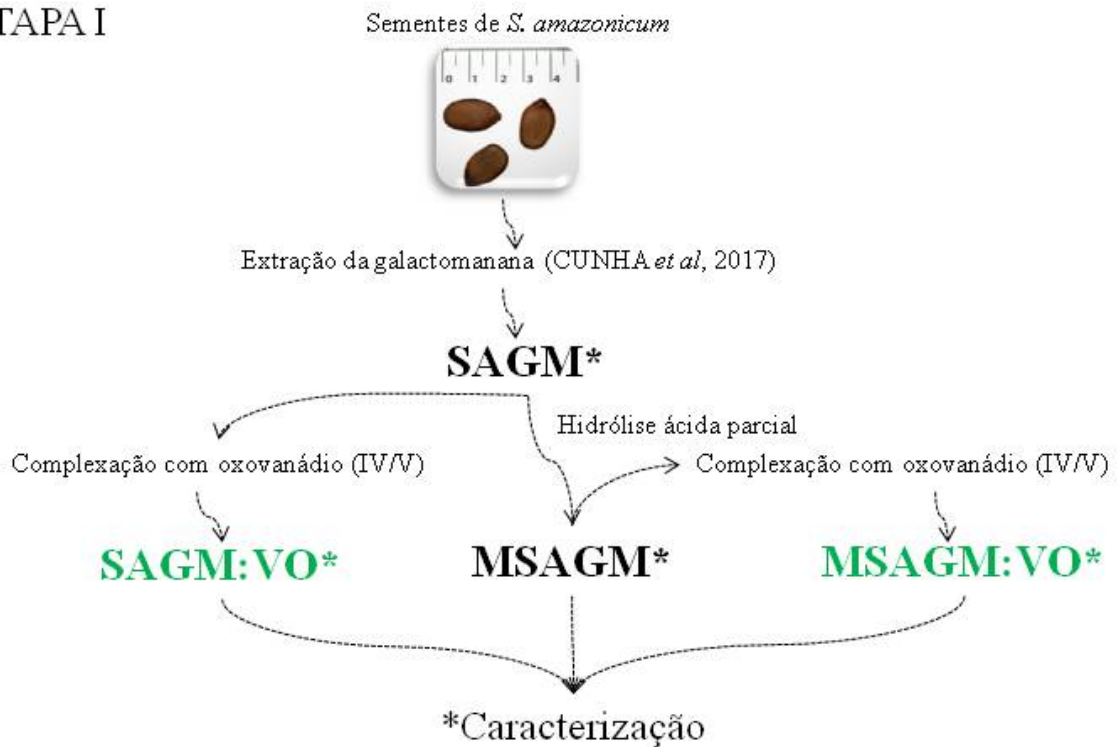
Ao contrário das células normais que provém sua energia da respiração celular, a maioria dos tumores de desenvolvimento rápido dependem principalmente da glicólise fermentativa mesmo quando o oxigênio é abundante (efeito Warburg) (WARBURG, 1956a; KROEMER; POUYSSEGUR, 2008; VANDER HEIDEN *et al.*, 2009a; HAY, 2016). Este fenótipo metabólico das células tumorais tem estimulado a investigação por novas terapias através da inibição específica da via glicolítica. Neste sentido, alguns estudos já foram conduzidos com o objetivo de inibir o primeiro passo da glicólise, como por exemplo, a utilização da 2 – deoxi – glucose (2 – DG) que é conhecida por ser um inibidor competitivo do transportador da glucose, assim como um inibidor da hexoquinase e glucose – 6 – fosfato isomerase (POUYSSEGUR *et al.*, 1980a; HAY, 2016; PUSAPATI *et al.*, 2016). No entanto, devido a sua toxicidade, 2 – DG não tem sido muito utilizado, pois além de inibir a via glicolítica, este composto também é capaz de inibir a via das pentoses fosfato.

Ao invés do uso de compostos com o intuito de inibir a glicólise, algumas pesquisas têm sido direcionadas para o silenciamento de genes específicos de alguns passos da via glicolítica, como por exemplo, a interrupção das lactato desidrogenases A e B (FANTIN *et al.*, 2006; LE *et al.*, 2010; BOUDREAU *et al.*, 2016; BRAND *et al.*, 2016) ou, a exportação do lactato pelos transportadores MCT-1e MCT-4 (LE FLOCH *et al.*, 2011; DOHERTY *et al.*, 2014; GRANJA *et al.*, 2014; MARCHIQ *et al.*, 2015). Considerando a relevância do silenciamento de genes importantes para o funcionamento da via glicolítica, o outro objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do silenciamento da enzima glucose – 6 – fosfato isomerase em células de adenocarcinoma de cólon humano (LS174T) em condições de normóxia e hipóxia. Neste sentido, os objetivos específicos foram avaliar os parâmetros relacionados com:

- A proliferação celular;
- A morte celular;
- O metabolismo glicolítico (ECAR) e mitocondrial (OCR);
- E em modelos xenográficos avaliar o efeito do silenciamento após o tratamento com fenformina (inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons).

### 3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

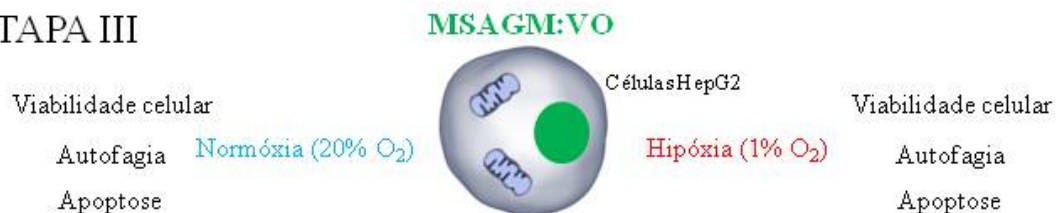
#### ETAPA I



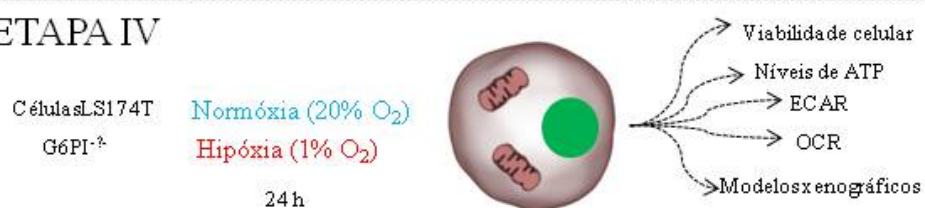
#### ETAPA II



#### ETAPA III



#### ETAPA IV



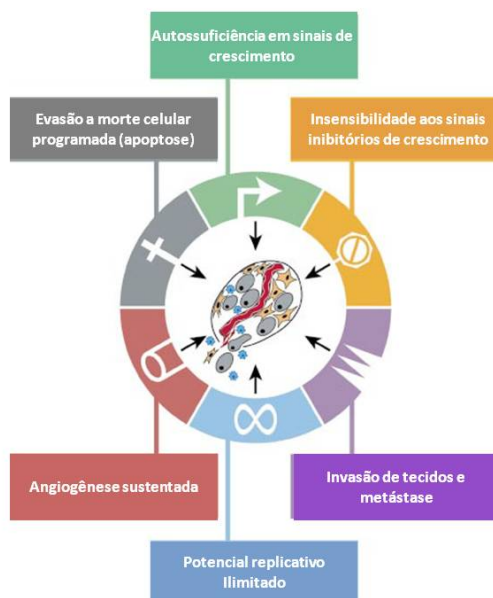
## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 CÂNCER

#### 4.1.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é uma doença que envolve mudanças na dinâmica do genoma e pode estar relacionado com alterações nos circuitos que regulam e governam a proliferação celular e a homeostase (HANAHAAN; WEINBERG, 2000; STRATTON *et al.*, 2009; HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Há indícios de que a tumorigênese em humanos ocorra como um processo de múltiplas etapas, reflexos de alterações genéticas, levando a transformação progressiva de células normais em células malignas (HANAHAAN; WEINBERG, 2000; HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Em meados de 2000, Hanahan & Weinberg descreveram seis alterações como essenciais para o desenvolvimento do câncer: 1) Autossuficiência em sinais de crescimento; 2) Insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento (anti-crescimento); 3) Fuga à morte celular programada (apoptose); 4) Potencial replicativo ilimitado; 5) Angiogênese sustentada e; 6) Invasão de tecidos e metástase (FIGURA 1).

FIGURA 1 - CAPACIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS TUMORAIS



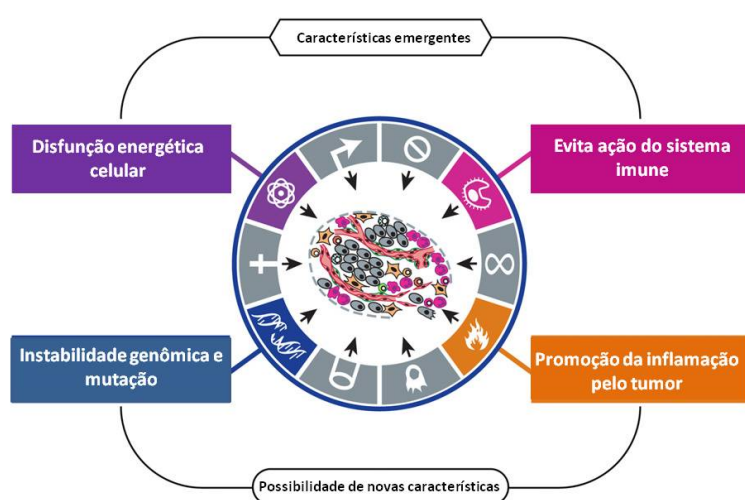
FONTE: Adaptado de HANAHAAN & WEINBERG, 2000, com autorização de Elsevier e Copyright Clearance Center (número de licença 4025930053558).

NOTA: As características fundamentais para o desenvolvimento do câncer estão relacionadas com: 1) Autossuficiência em sinais de crescimento; 2) Insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento (anti-crescimento); 3) Evasão a morte celular programada (apoptose); 4) Potencial replicativo ilimitado; 5) Angiogênese sustentada e; 6) Invasão de tecidos e metástase.



No entanto, onze anos após, os mesmos autores Hanahan & Weinberg, (2011) propuseram que fossem adicionadas mais duas alterações, a reprogramação do metabolismo energético e a capacidade das células tumorais em evitar a sua destruição via sistema imune (FIGURA 2). Ambas facilitam o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de cânceres em humanos e, portanto, são consideradas fundamentais no que se diz respeito à fisiologia do câncer (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DA FISIOLÓGIA DAS CÉLULAS TUMORAIS



FONTE: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011, com autorização de *Elsevier and Copyright Clearance Center* (número de licença 4026010140513).

NOTA: Características da fisiologia das células tumorais. Pesquisas sugerem duas características adicionais que estão relacionadas na patogênese do câncer ou talvez em todos os tipos de cânceres. Uma delas seria a capacidade de modificar, ou reprogramar o metabolismo celular (disfunção energética celular) a fim de suportar a alta demanda da proliferação das células tumorais. A outra característica seria em relação ao sistema imune, onde as células tumorais evitam o bom funcionamento dos linfócitos B e T, macrófagos e células natural *killer*. Adicionalmente a essas características, seria a instabilidade genômica, portanto, mutação das células tumorais, levando as alterações genéticas, impulsionando a progressão do tumor. E a promoção da inflamação pelo tumor devido ao aumento da ativação de células imunes.

Na última década, grandes avanços foram alcançados em relação ao entendimento do metabolismo do câncer (SCHULZE; HARRIS, 2012; CAIRNS; MAK, 2016; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). A reprogramação metabólica no câncer é caracterizada pela ativação de vias metabólicas, como a glicólise, via das pentoses fosfato, metabolismo lipídico (síntese e oxidação de ácidos graxos), glutaminólise e biogênese mitocondrial (SCHULZE; HARRIS, 2012; CAIRNS; MAK, 2016). Estas alterações no metabolismo têm como objetivo gerar energia e precursores essenciais para a biossíntese de moléculas, para sustentar a rápida

proliferação, invasão de tecidos, metástase, sobrevivência e resistência a terapias anticâncer (SCHULZE; HARRIS, 2012; CAIRNS; MAK, 2016). Esta plasticidade metabólica é essencial porque permite que as células tumorais se adaptem às novas condições do microambiente tumoral (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

## 4.2 METABOLISMO DO CÂNCER

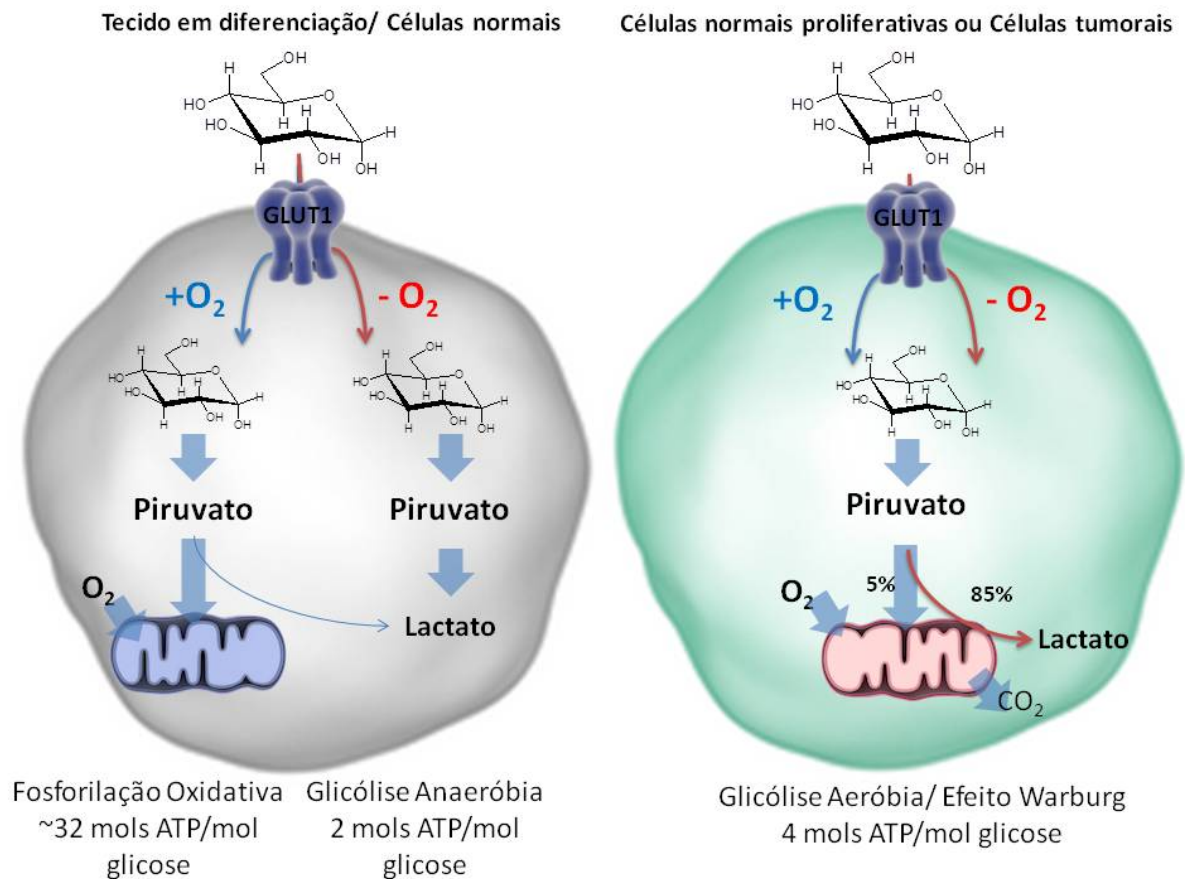
### 4.2.1 Efeito Warburg

Em se tratando do perfil metabólico das células cancerosas, é praticamente impossível não citar Otto Warburg, um cientista alemão, que em meados de 1920 fez uma importante descoberta (WARBURG, 1925; WARBURG, 1956b). Warburg constatou que mesmo na presença de oxigênio, as células tumorais produzem ATP preferencialmente pela via glicolítica, em detrimento a fosforilação oxidativa e propôs que este comportamento apresentado pelas células tumorais poderia ser devido à disfunção mitocondrial, o que justificaria o aumento compensatório da via glicolítica para produção de ATP, o que é descrito até os dias atuais como “Efeito Warburg” (FIGURA 3) (WARBURG, 1956b; XU *et al.*, 2005; KOPPENOL *et al.*, 2011; MALDONADO; LEMASTERS, 2012; MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016). No entanto, embora tenha sido confirmado o aumento da taxa glicolítica nas células tumorais, como relatado por Warburg, atualmente sabe-se que muitas células tumorais podem utilizar outras vias metabólicas como, por exemplo, glutaminólise e síntese e/ou oxidação dos ácidos graxos (FIGURA 5) indicando que as mitocôndrias dessas células são funcionais (VANDER HEIDEN, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Células tumorais que apresentam o efeito Warburg são relacionadas a um mau prognóstico (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016). Adicionalmente, o alto consumo de glucose por estas células tem sido útil para a detecção química e monitoramento de tumores (SOM *et al.*, 1980), como por exemplo, pela tomografia por emissão de pósitrons (TEP), considerada uma ferramenta fundamental na detecção e acompanhamento do tratamento de cânceres. Na TEP, um análogo da glucose, a deoxiglucose, é ligada ao isótopo radioativo  $^{18}\text{F}$  (Fluorodesoxiglucose -  $^{18}\text{F}$ -FDG) e então é injetada nos pacientes (SOM *et al.*, 1980; CZERNIN; PHELPS, 2002; ALMUHAIDEB *et al.*, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). As regiões que apresentam alta taxa de metabolização de glucose, como tumores e regiões do cérebro, são detectadas pela TEP. Este exame possibilita que anormalidades metabólicas sejam detectadas mesmo antes de ocorrerem alterações morfológicas, permitindo a

localização anatômica das lesões (SOM *et al.*, 1980; CZERNIN; PHELPS, 2002; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

FIGURA 3- EFEITO WARBURG, PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE CÉLULAS NORMAIS E CÉLULAS TUMORAIS



FONTE: Adaptado de VANDER HEIDEN *et al.*, (2009), com autorização de *The American Association for the Advancement of Science (AAAS)* (número de licença 3958290953194).

NOTA: Diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (Efeito Warburg). Na presença de oxigênio, as células normais, como os tecidos em diferenciação, primeiro realizam a oxidação da glicose em piruvato pela via glicolítica para depois o piruvato ser metabolizado na mitocôndria levando a geração de CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico). Durante o processo da fosforilação oxidativa, o oxigênio é essencial por ser o aceptor final de elétrons. Em limitada disponibilidade de oxigênio as células tumorais redirecionam o piruvato gerado pela via glicolítica para a geração de lactato (glicólise anaeróbica). Essa geração de lactato durante a glicólise anaeróbica permite a reciclagem de NADH em NAD<sup>+</sup>, resultando em uma quantidade mínima de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa. Warburg observou que as células cancerosas tendem a converter a maioria da glicose a lactato mesmo na presença de oxigênio (glicólise aeróbica).

A reprogramação metabólica nas células tumorais envolve alterações na expressão gênica, diferenciação celular e no microambiente tumoral. Em geral, as células tumorais metabolizam glicose, lactato, piruvato, hidroxibutirato, acetato, glutamina e ácidos graxos em taxas muito mais elevadas quando comparadas às células não tumorais (VANDER HEIDEN, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

As células não tumorais utilizam tanto a glicólise aeróbia como a fosforilação oxidativa para a produção de ATP, embora uma delas possa ser predominante em determinado tipo celular. A conversão da glucose a lactato gera duas moléculas de ATP, enquanto sua oxidação completa através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e fosforilação oxidativa resulta em 30 ou 32 moléculas de ATP, ou seja, uma quantidade 15 vezes maior (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009b; MALDONADO; LEMASTERS, 2012; MARCHIQ; POUYSSÉGUR, 2015; MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016). Alguns estudos indicam que a maior captação de glucose pelas células tumorais para a produção de energia pela via glicolítica ao invés da fosforilação oxidativa, está relacionada com a biossíntese de macromoléculas e ao processo redox (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; MALDONADO; LEMASTERS, 2012; MARCHIQ; POUYSSÉGUR, 2015; PARKS *et al.*, 2016).

Ainda, é preciso considerar que uma molécula de ATP pode ser sintetizada pela via glicolítica em velocidade 100 vezes maior do que a fosforilação oxidativa. Assim, mesmo o rendimento energético sendo 15 vezes menor a alta atividade da via glicolítica é sustentada pela maior expressão dos transportadores de glucose e de enzimas desta via, o que seria suficiente ou até mesmo ideal para garantir a sobrevivência e proliferação das células tumorais (SEMENZA, 2009; PARKS *et al.*, 2016).

A alta taxa glicolítica em células tumorais é consequência de vias de sinalização intracelular desreguladas, como por exemplo, as vias da PI3K e a ativação de oncogenes como o MYC e KRAS (WEINBERG; CHANDEL, 2009; WEINBERG; CHANDEL, 2015). Além disso, sabe-se que os fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIF) e pelo fator de transcrição Myc, agindo separadamente ou em conjunto, mantêm a alta expressão das enzimas da via glicolítica em mais de 70 % dos cânceres (SEMENZA, 2007; SEMENZA, 2009). Alguns estudos sugerem que o HIF-1 $\alpha$  ativa genes glicolíticos em condições de hipóxia (glicólise anaeróbia), enquanto que Myc regula o mesmo conjunto de genes em condições normais de oxigênio. Estas observações sugerem que ambos os fatores de transcrição contribuem para o efeito Warburg, pois estão relacionados com a capacidade de converter glucose em piruvato e, por sua vez, em lactato mesmo em condições de normóxia (DANG *et al.*, 2008).

Além de promover a glicólise, o Myc também é essencial na regulação da fosforilação oxidativa, pois está envolvido na modulação de genes relacionados à biogênese mitocondrial e na transcrição do DNA mitocondrial (DANG *et al.*, 2009; WEINBERG; CHANDEL, 2015). Este fator de transcrição também é capaz de modular a expressão de proteínas chaves na regulação da glutaminólise, como por exemplo, os transportadores de glutamina (ASCT) e da

enzima glutaminase (GLS) em diversas linhagens tumorais resultando em um aumento na fosforilação oxidativa (DANG et al., 2009).

#### 4.2.2 Via das pentoses fosfato

Na maioria dos tecidos, 80 – 90% da glucose é metabolizada pela via glicolítica e o restante pela via das pentoses fosfato (VPF). A principal característica da VPF é gerar precursores para a síntese de nucleotídeos e NADPH. O NADPH é importante para a síntese de ácidos graxos e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que atua como coenzima em reações destas vias (HORECKER, 2002; TENNANT *et al.*, 2010). Assim, VPF tem papel importante na sobrevivência e proliferação das células tumorais, principalmente devido à alta demanda anabólica nestas células, além de favorecer as defesas antioxidantes (BOARD *et al.*, 1990; WAMELINK *et al.*, 2008; RIGANTI *et al.*, 2012; PATRA; HAY, 2014).

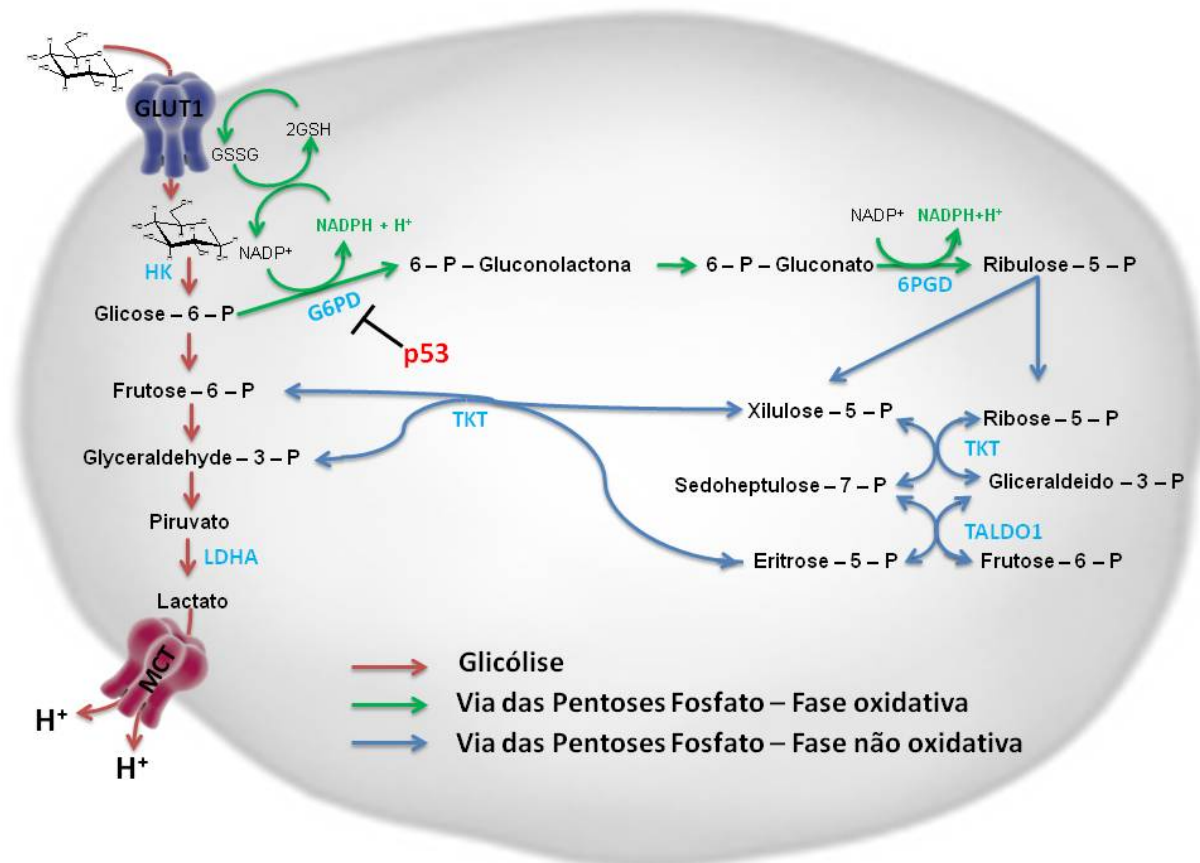
A VPF pode ser dividida em duas fases: a oxidativa e a não oxidativa (FIGURA 4). A fase oxidativa é responsável pela geração de NADPH e ribonucleotídeos, através de três reações irreversíveis. Por sua vez, a fase não oxidativa compreende uma série de reações reversíveis que fornecem intermediários para a via glicolítica, como a frutose-6-fosfato (F6F) e gliceraldeído – 3 – fosfato (G3F), podendo ser convertidos em pentose fosfato e vice-versa (JIANG *et al.*, 2014; PATRA; HAY, 2014).

Em algumas linhagens de células tumorais, as duas primeiras enzimas da fase oxidativa da via das pentoses fosfato são mais ativas (BOARD et al., 1990), resultando na maior disponibilidade de NADPH. Como mencionado, o NADPH atua como coenzima em reações antioxidantes, como na reação catalisada pela glutathione redutase, que mantém os níveis de glutathione reduzida (GSH), considerado um potente antioxidante celular (FIGURA 4), possuindo um papel importante na remoção de ROS (WAMELINK et al., 2008; JIANG et al., 2014).

Tem sido proposto que o aumento do fluxo glicolítico pelas células tumorais também gera um impacto indireto na fase não oxidativa da via das pentoses fosfato. Por exemplo, a hexoquinase 2 (HK2), que é altamente expressa em células tumorais, além de sustentar a via glicolítica é também requerida para o aumento da síntese de ribonucleotídeos. O alto fluxo glicolítico em células tumorais em condições de hipóxia aumenta a quantidade de F6F e G3F, que podem ser utilizados pela fase não oxidativa, sendo assim, a via glicolítica pode regular o

fluxo da glucose para a fase não oxidativa da via das pentoses fosfato (RIGANTI *et al.*, 2012).

FIGURA 4 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA GLICOLÍTICA E VIA DAS PENTOSE FOSFATO



FONTE: Adaptado de JIANG *et al* (2014) com autorização de Springer and BioMed Central (This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited).

NOTA: A fase oxidativa da via das pentoses fosfato (VPF) tem um rendimento de duas moléculas de NADPH. A fase não oxidativa da via das pentoses fosfato produzem ribose - 5 - fosfato originária da fase oxidativa como também de intermediários da via glicolítica. Leia-se: G6PD, glucose - 6 - fosfato desidrogenase; 6PGD, 6 - fosfogluconato desidrogenase; TKT, transcetolase; TALDO1, transaldolase; GLUT, transportador da glucose e LDH-A, lactato desidrogenase A.

A disponibilidade de glucose influencia diretamente a velocidade da via das pentoses fosfato. Se não houver glucose suficiente, há uma diminuição nos níveis de NADPH e consequentemente um aumento nos níveis de ROS intracelulares acima de um determinado limiar que pode provocar a morte celular. Além disso, a redução dos níveis de ribonucleotídeos pode comprometer a síntese de DNA (WAMELINK *et al.*, 2008; PATRA; HAY, 2014).

Estudos demonstram que o supressor tumoral p53 está relacionado com a regulação da via das pentoses fosfato (FIGURA 4). Como p53 é um fator de transcrição, este se liga a

regiões promotoras de genes que estão envolvidos em pontos de controle da via, dentre esses, destacam-se as regiões promotoras dos genes dos transportadores de glucose GLUT1 e GLUT4, que consequentemente têm sua expressão inibida. Além disso, p53 pode interferir diretamente na fase oxidativa pela inibição da enzima glucose – 6 – fosfato desidrogenase (G6PD) (JIANG *et al.*, 2014). No entanto, p53 na maioria dos cânceres é mutado, favorecendo a captação da glucose e, desta forma, a ativação das vias glicolítica e das pentoses fosfato nestas células (JIANG *et al.*, 2014; PATRA; HAY, 2014).

O aumento da atividade da via das pentoses fosfato tem sido associado a mecanismos de resistência das células tumorais a quimioterápicos, especialmente aqueles que causam estresse oxidativo e/ou danos ao DNA. Isto porque esta via é estimulada em resposta ao aumento de ROS, ocasionado por tratamentos como a radiação, levando a uma resposta adaptativa das células tumorais. Esta resposta é caracterizada por altos níveis de G6PD e GSH, relacionados ao estímulo da fase oxidativa. Neste contexto, alguns estudos sugerem que este tipo de resistência poderia ser revertida pelo tratamento de compostos que interfiram na via das pentoses fosfato, como a desidroepiandrosterona (DHEA) e/ou 6 – nicotinamida (6-AN), que inibem o primeiro e segundo passo da fase oxidativa, respectivamente. Esta inibição resulta na redução da proliferação celular de algumas linhagens de câncer, assim como na diminuição dos níveis de NADPH (RAMOS-MONTOYA *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2015; DE PRETER *et al.*, 2016).

#### 4.2.3 Microambiente tumoral e *Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1 $\alpha$ )

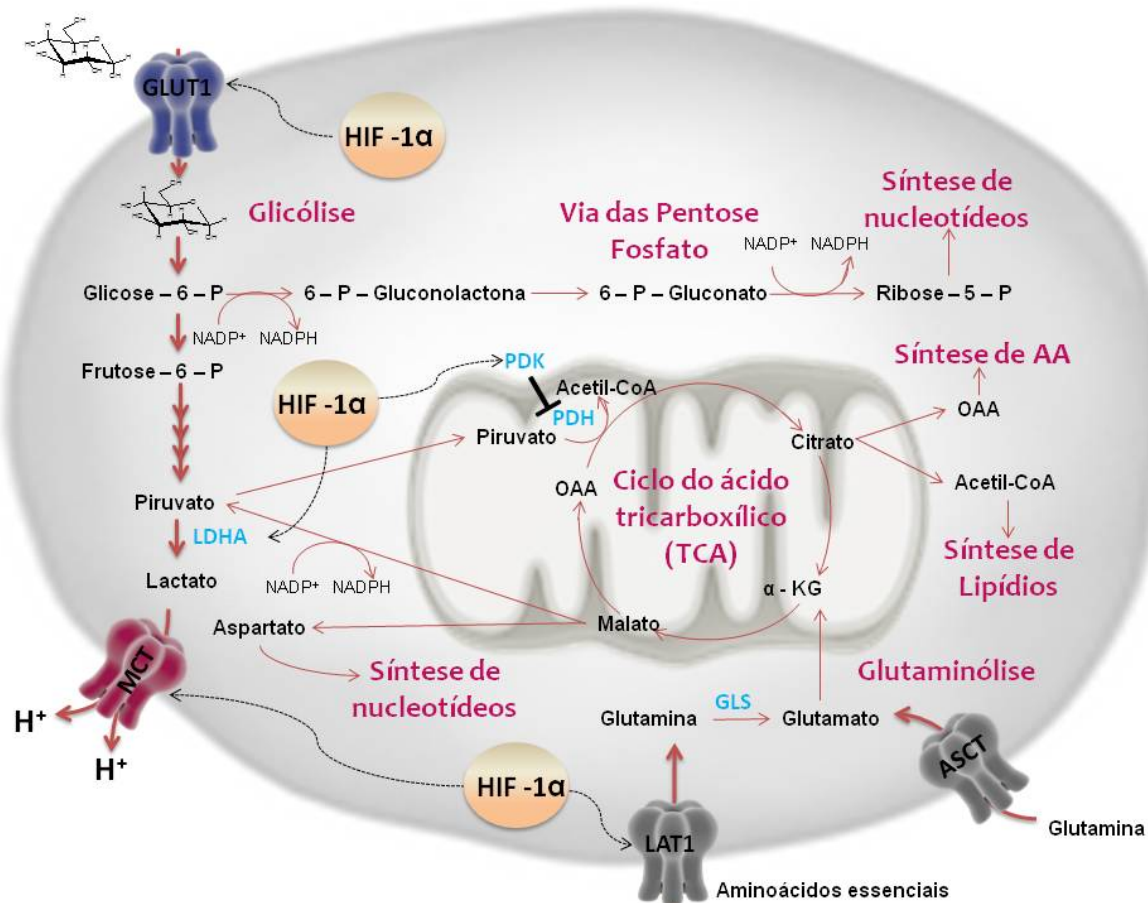
No ambiente microtumoral a disponibilidade de oxigênio é variável o que faz com que as células tumorais desenvolvam mecanismos de adaptação a estas condições com a finalidade de garantir sua proliferação e sobrevivência (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2011; PARKS *et al.*, 2013b; MARCHIQ; POUYSSÉGUR, 2015; PARKS *et al.*, 2016). Devido à facilidade experimental, a maioria dos estudos que avaliam novos compostos com potencial antitumoral é desenvolvida em normóxia, enquanto que a condição de hipóxia é menos frequente. Em condições de hipóxia, as células tumorais expressam o fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ , responsável por estimular a transcrição de inúmeros genes, principalmente àqueles relacionados à ativação do metabolismo glicolítico. Sendo assim, hipóxia inicia uma cascata de eventos que permitem as células tumorais se proliferarem rapidamente (BRAHIMI-HORN *et al.*, 2007).



Alguns agentes antitumorais têm seus efeitos aparentemente modulados pela disponibilidade de oxigênio. A indução de morte celular pela estaurosporina (STS), por exemplo, é menor em células LS174T em condições de hipóxia em comparação as mesmas células mantidas em condições de normóxia. No estudo realizado por Brahimi – Horn e colaboradores (2012) aponta que a resistência a apoptose observada pela STS representa um obstáculo para a terapia do câncer. Embora, seja uma característica das células tumorais em hipóxia, os mecanismos envolvidos nesta resistência ainda não são totalmente compreendidos (BRAHIMI-HORN et al., 2012).

Muitas décadas de pesquisa resultaram na descoberta de genes envolvidos na progressão tumoral, bem como no conhecimento de mecanismos envolvidos nas alterações do DNA nas células tumorais (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). Entretanto, sabe-se atualmente que somente as alterações no genoma não explicam como as células tumorais são capazes de restabelecer seu estoque de energia e gerar precursores que possibilitem sua rápida proliferação (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016). Neste contexto, a ativação de determinados genes em resposta a fatores de transcrição, como o HIF-1, é decisiva para sobrepor a limitação de nutrientes e de oxigênio, alterações comuns no microambiente tumoral o que está relacionado na modulação do metabolismo tumoral. (FIGURA 5) (MARCHIQ; POUYSSÉGUR, 2015; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS DE CÉLULAS TUMORAIS



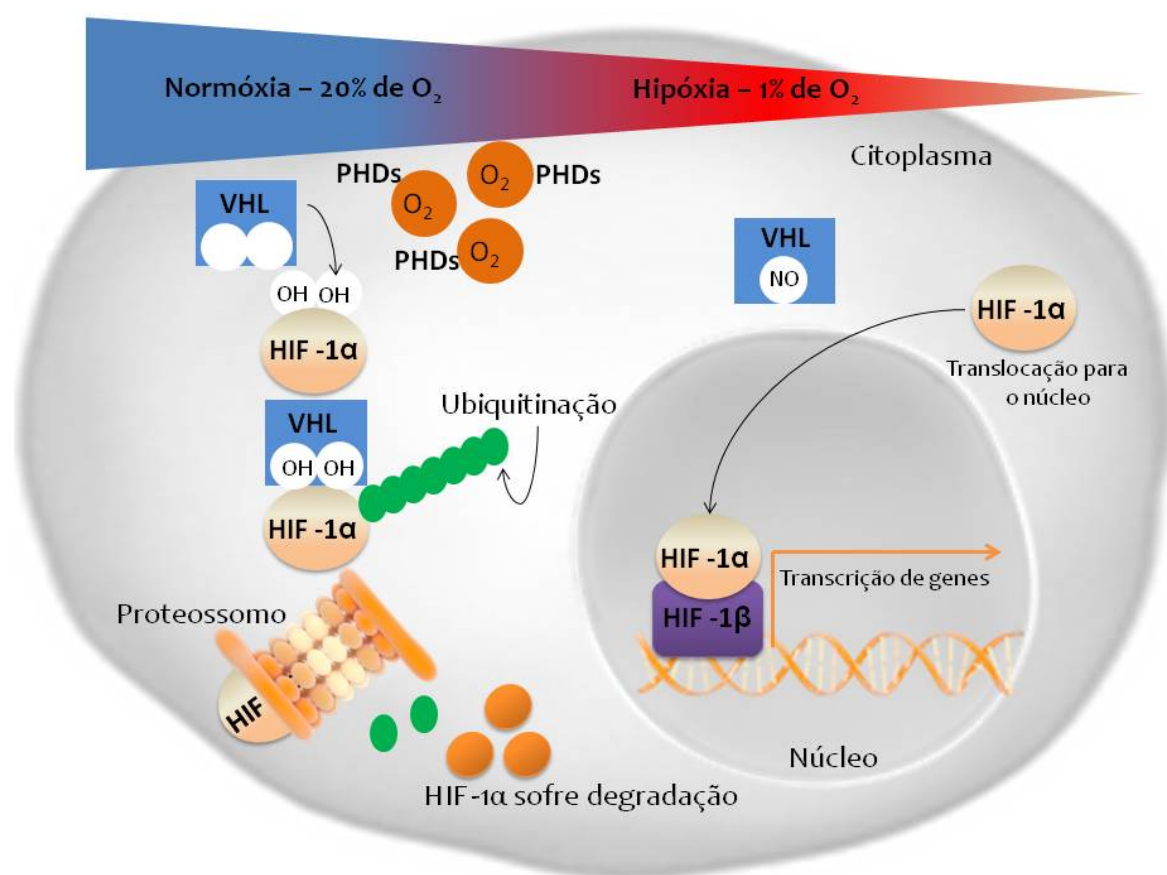
FONTE: Adaptado de MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al* (2016), com autorização de Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center (número da licença: 3984210758160) e MARCHIQ; POUYSSÉGUR (2015) com autorização de Springer and BioMed Central (This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited).

NOTA: Células tumorais possuem um alto metabolismo anabólico, similar às células normais proliferativas. Células do câncer captam uma alta concentração de glucose (pelos transportadores GLUT1 ou GLUT4) e glutamina (pelo transportador ASCT). Uma vez que a glucose entra nas células, esta é rapidamente oxidada a piruvato pela via glicolítica, sendo convertida a lactato pela lactato desidrogenase A (LDHA). No entanto, o catabolismo do piruvato pelo Ciclo do ácido tricarboxílico pode ser restrito devido à inibição da enzima piruvato desidrogenase mitocondrial (PDH) a qual é inibida pela enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK) sendo induzida pelo fator induzido por hipóxia (HIF-1). A via glicolítica pode gerar ainda outro intermediário importante, a glucose-6-fosfato (Glucose-6-P) a qual é metabolizada pela Via das Pentose Fosfato produzindo intermediários como o NADPH e Ribose-5-fosfato (Ribose-5-P) para síntese de glutathione e ácidos nucleicos, respectivamente. Uma via alternativa de fonte de energia que as células tumorais utilizam, seria a Glutaminólise. Primeiramente o glutamato é convertido à glutamina no citosol pela enzima glutaminase (GLS), a glutamina entra no ciclo do ácido tricarboxílico pela conversão de glutamato a α-cetoglutarato (α-KG). A glutaminólise também tem um papel importante na síntese de lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos e geração de lactato o qual é transportado para fora das células pelo transportador monocarboxílico (MCT).

O fator de transcrição HIF-1 é um heterodímero composto por subunidades de HIF-1α e HIF-1β, responsável por modular mais de 100 genes (WANG *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1998; SEMENZA, 2001; SEMENZA, 2007; SEMENZA, 2009). Enquanto que HIF-1β é expresso constitutivamente, HIF-1α é expresso conforme a disponibilidade de oxigênio. Em condições de normóxia, HIF-1α sofre ubiquitinação e degradação proteossomal devido à

ligação com a proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (VHL) (HUANG *et al.*, 1998). VHL se liga a HIF-1 $\alpha$  apenas quando hidroxilada no resíduo de prolina 402 e/ou 564. A reação de hidroxilação é catalisada por prolil hidroxilases (PHDs) que utilizam O<sub>2</sub> e  $\alpha$ -cetoglutarato como substratos, gerando dióxido de carbono e succinato como produtos finais. Já em condições de hipóxia, a hidroxilação, ubiquitinação e a degradação proteossomal são inibidas, levando um acúmulo de HIF-1 $\alpha$ , o que resulta no aumento da transcrição de diversos genes, em especial aqueles relacionados à via glicolítica (HUANG *et al.*, 1998; SEMENZA, 2009) (FIGURA 6).

FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTABILIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE HIF-1 EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA EM CÉLULAS TUMORAIS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: em condições de normóxia (20% de oxigênio), HIF-1 sofre degradação proteossomal, pela ação das PHDs e VHL. Em condições de normóxia VHL é S-nitrozilado perdendo sua função, impedindo sua ligação com HIF-1 $\alpha$  que em seguida é translocado para o núcleo se ligando ao HIF-1 $\beta$  consequentemente levando a expressão de inúmeros genes, incluindo aqueles relacionados à via glicolítica, como por exemplo, os transportadores GLUT, MCT e LAT, as enzimas hexoquinase, glucose – 6 – fosfato isomerase, lactato desidrogenase A e dentre outras.

Os níveis elevados de HIF-1 $\alpha$ , não somente estimulam a via glicolítica, como também podem inibir a respiração mitocondrial (KIM *et al.*, 2006). A atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH), que converte piruvato a acetil-CoA, é regulada através da fosforilação

reversível ocasionada pela enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), consequentemente inibindo a atividade de PDH (KAPLON *et al.*, 2013), a ação de PDK é estimulada pelo fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (FIGURA 5). A inibição de PDH mediada por HIF-1 $\alpha$  é uma das principais características do efeito Warburg (HUANG *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2006).

#### 4.3 ALGUNS ALVOS METABÓLICOS NA TERAPIA DO CÂNCER

##### 4.3.1 Metabolismo glicolítico e reprogramação metabólica mitocondrial

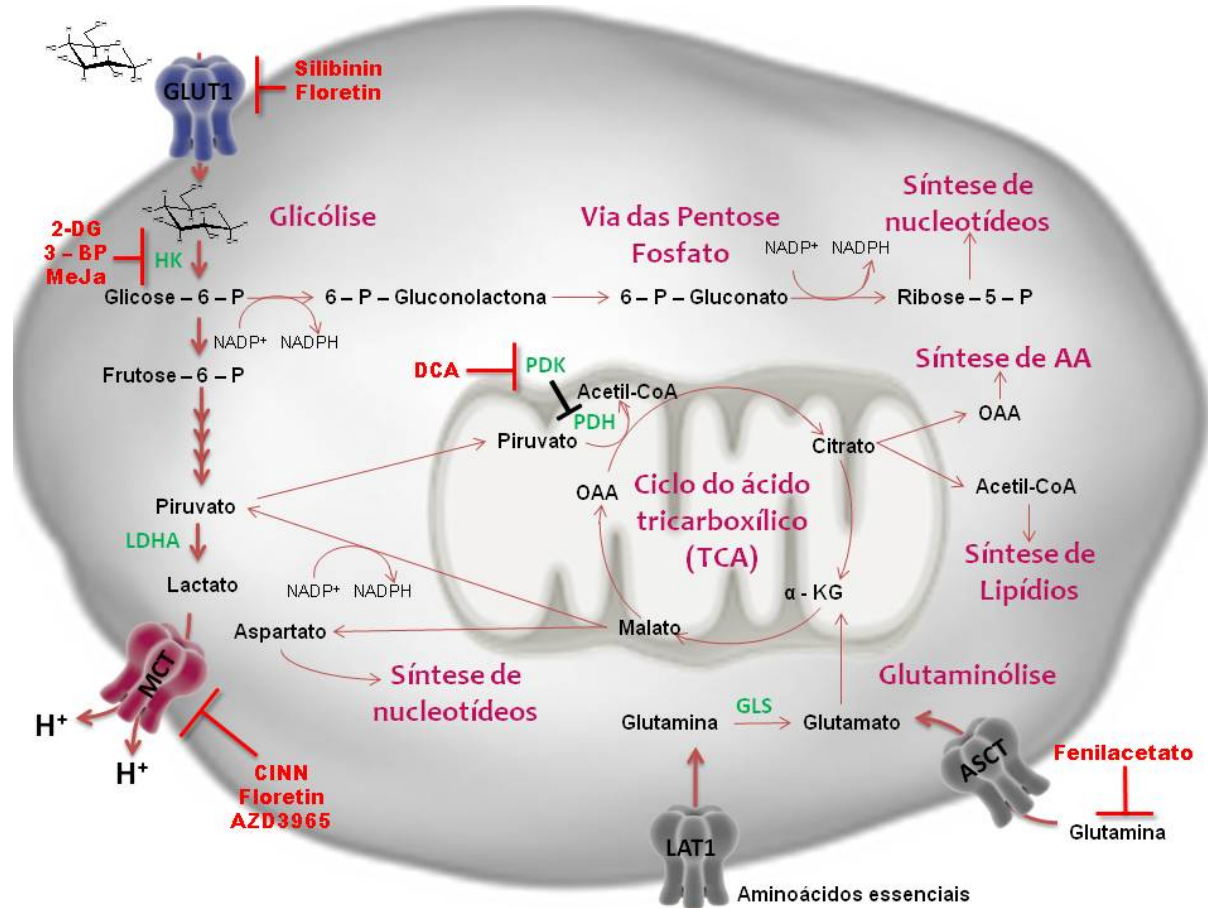
A busca por novos tratamentos para o câncer, que sejam efetivos e menos tóxicos, é constante. Neste contexto, o entendimento das diferenças metabólicas entre células normais e tumorais, é essencial para desenvolver e delinear compostos seletivos para as células tumorais (PELICANO *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2005; PELICANO *et al.*, 2006; GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013; CAIRNS; MAK, 2016; PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

O efeito Warburg, é a alteração metabólica universal mais significativa na maioria das células tumorais. Portanto, compostos que são direcionados para atuar na glicólise poderiam ser uma alternativa terapêutica promissora (XU *et al.*, 2005; PELICANO *et al.*, 2006; SCATENA *et al.*, 2008; TENNANT *et al.*, 2010; GANAPATHY-KANNIAPPAN; GESCHWIND, 2013). Acredita-se que inibindo alvos importantes para o suprimento de nutrientes, como por exemplo, os transportadores de glucose (GLUT1), enzimas chaves envolvidas na oxidação deste substrato, como a hexoquinase (HK), piruvato quinase 2 (PKM2), lactato desidrogenase A (LDH-A) bem como o transportador monocarboxilado (MCT) comprometeria a provisão de ATP e de precursores para sustentar a alta taxa proliferativa das células tumorais, tendo como consequência a morte celular (FIGURA 7) (PELICANO *et al.*, 2006; TENNANT *et al.*, 2010; MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016).

O primeiro passo da via glicolítica, a fosforilação da glucose para formação da glucose – 6 – fosfato, é catalisada pela enzima hexoquinase II (HK). Esta enzima é regulada pelo fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  e é altamente expressa em células tumorais. Atualmente são conhecidos inibidores da hexoquinase, como a londamina, 2-deoxiglucose (2 – DG), 3 – Bromopiruvato (3 – BR) e metil jasmonato (MeJA), os quais são utilizados em combinação com outros agentes para o tratamento de diferentes tumores sólidos (FIGURA 7) (FERREIRA, 2010; TENNANT *et al.*, 2010; MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016). No entanto, alguns

estudos clínicos mostraram que estes inibidores apresentam uma alta toxicidade, restringindo estas terapias (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2016).

FIGURA 7 - ALVOS METABÓLICOS NA TERAPIA DO CÂNCER



FONTE: Adaptado de TENNANT; DURÁN; GOTTLIEB (2010) com autorização de *Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center* (número da licença: 4032020335929).

NOTA: Alguns compostos anticâncer (destacados em vermelho) que atualmente são utilizados na clínica como agentes adjuvantes no tratamento de diversos tipos de cânceres. A lisdamina, 2-deoxiglicose (2 – DG), 3 – Bromopiruvato (3 – BR) e metil jasmonato (MeJA), inibidores da primeira enzima da via glicolítica Hexoquinase (HK); Silibina e Florentin que inibem a captação da glicose pelo transportador GLUT1; CINN, Florentin e AZD3965, responsáveis pela inibição do transportador de lactato (MCT) e DCA, inibidor da PDK que como consequência ativa a PDH.

Uma vez que o efeito Warburg não está necessariamente correlacionado com a disfunção mitocondrial, muitos tumores que exibem o fenótipo glicolítico podem manter a mesma eficiência da fosforilação oxidativa observada em células não tumorais (ZU; GUPPY, 2004; WEINBERG; CHANDEL, 2009; FULDA *et al.*, 2010; KOPPENOL *et al.*, 2011). Sabendo que as mitocôndrias são essenciais para a provisão de energia e estão envolvidas em diferentes vias de morte celular, estas organelas têm sido alvo de pesquisas com diferentes compostos para o tratamento do câncer (WEINBERG; CHANDEL, 2009; FULDA *et al.*, 2010; SOLAINI *et al.*, 2011; ZONG *et al.*, 2016).

Na glutaminólise, a glutamina é convertida a glutamato na reação catalisada pela glutaminase e o glutamato é convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato pela glutamato desidrogenase. O  $\alpha$ -cetoglutarato alimenta o ciclo de Krebs e, consequentemente, há uma ativação fosforilação oxidativa (FIGURA 4) (WEINBERG; CHANDEL, 2015).

Neste contexto, Marroquin e colaboradores (2007), demonstraram que células HepG2 cultivadas em meio contendo galactose/glutamina são mais dependentes da fosforilação oxidativa para obtenção de ATP, tornando-se, assim, mais suscetíveis a ação de inibidores do transporte de elétrons na cadeia respiratória.

Outra forma de desviar o metabolismo glicolítico para a fosforilação oxidativa, seria a realização do *knockout* (KO) em transportadores e enzimas essenciais da glicólise (MARCHIQ *et al.*, 2014; CORMERAIS *et al.*, 2016). Neste aspecto, Marchiq e colaboradores (2014) realizaram o KO no transportador MCT (transportadores monocarboxilados), via nucleases de dedo de zinco em modelos de tumores glicolíticos de células LS174T e glioblastoma humano (U87G). O KO foi capaz de reduzir o transporte de ácido láctico promovendo um acúmulo de lactato intracelular, redirecionando o metabolismo dessas células para a fosforilação oxidativa, pela reativação do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, permitindo que as células não fossem levadas a morte celular. Os autores ainda demonstraram que incubando essas células deficientes em MCT com a fenformina, um inibidor do complexo I, tanto em condições de normóxia quanto em condições de hipóxia, as células reduziram os níveis de ATP levando a morte celular.

O segundo passo da via glicolítica, onde a conversão da glucose – 6 – fosfato à frutose – 6 – fosfato é catalisada pela enzima glucose – 6 – fosfato isomerase (GPI), também tem sido alvo de estudos (TSUTSUMI *et al.*, 2003; FUNASAKA *et al.*, 2007a; FUNASAKA *et al.*, 2007b; FUNASAKA *et al.*, 2009). GPI possui um importante papel no metabolismo glicolítico, pois também está envolvida na via da gluconeogênese. Além disso, GPI age como um fator de motilidade autócrina sendo um importante fator que estimula a motilidade celular, invasão, metástase, além de inibir a expressão de Apaf-1 e caspase 9, prevenindo a apoptose (MUNOZ-PINEDO *et al.*, 2012; PAYEN *et al.*, 2016; YU; LI, 2017). Sendo assim, alterações na expressão e/ou atividade de GPI causadas por mutações podem ser de importância significativa, uma vez que a sua presença no soro e na urina de pacientes está relacionada ao prognóstico associado à progressão de certos tipos de cânceres (YU; LI, 2017).

#### 4.3.2 Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de elétrons, como por exemplo, radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), radicais orgânicos ( $R^{\bullet}$ ), radicais peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ) e radicais alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ) e espécies não-radicalares, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ) e hidroperóxido orgânicos ( $ROOH$ ) (YANG *et al.*, 2013).

A cadeia respiratória mitocondrial das células eucarióticas, principalmente nos complexos I e III, é a maior fonte de ROS intracelular (GALLUZZI *et al.*, 2012a; GALLUZZI *et al.*, 2012b; SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014). Durante a respiração, ROS são produzidas mesmo em condições de homeostase, pois participam de vias de sinalização, sendo seus níveis controlados por defesas antioxidantes mitocondriais, citosólicas e peroxissomal (FIGURA 8) (MATES *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006).

As defesas antioxidantes incluem as enzimas superóxido dismutase (MnSOD ou CuZnSOD), que catalisam a dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , catalase (CAT), que decompõem  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , peroxirredoxinas (PRX), que reduzem o  $H_2O_2$ ; tioredoxinas (TRX) que são proteínas contendo grupos tióis em sua estrutura, podendo ter a capacidade de tamponar ROS através da formação de ligações dissulfeto e dentre outras (FIGURA 8) (HALLIWELL, 2007; REUTER *et al.*, 2010). Tais defesas podem reestabelecer a homeostase em resposta a um estresse oxidativo (MATES *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006). No entanto, se o estresse oxidativo persistir, causando, por exemplo, a: lipoperoxidação, o enovelamento incorreto de proteínas e/ou mutações no DNA mitocondrial, o resultado final pode ser a indução de morte celular (MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007; INDRAN *et al.*, 2011) (FIGURA 8).

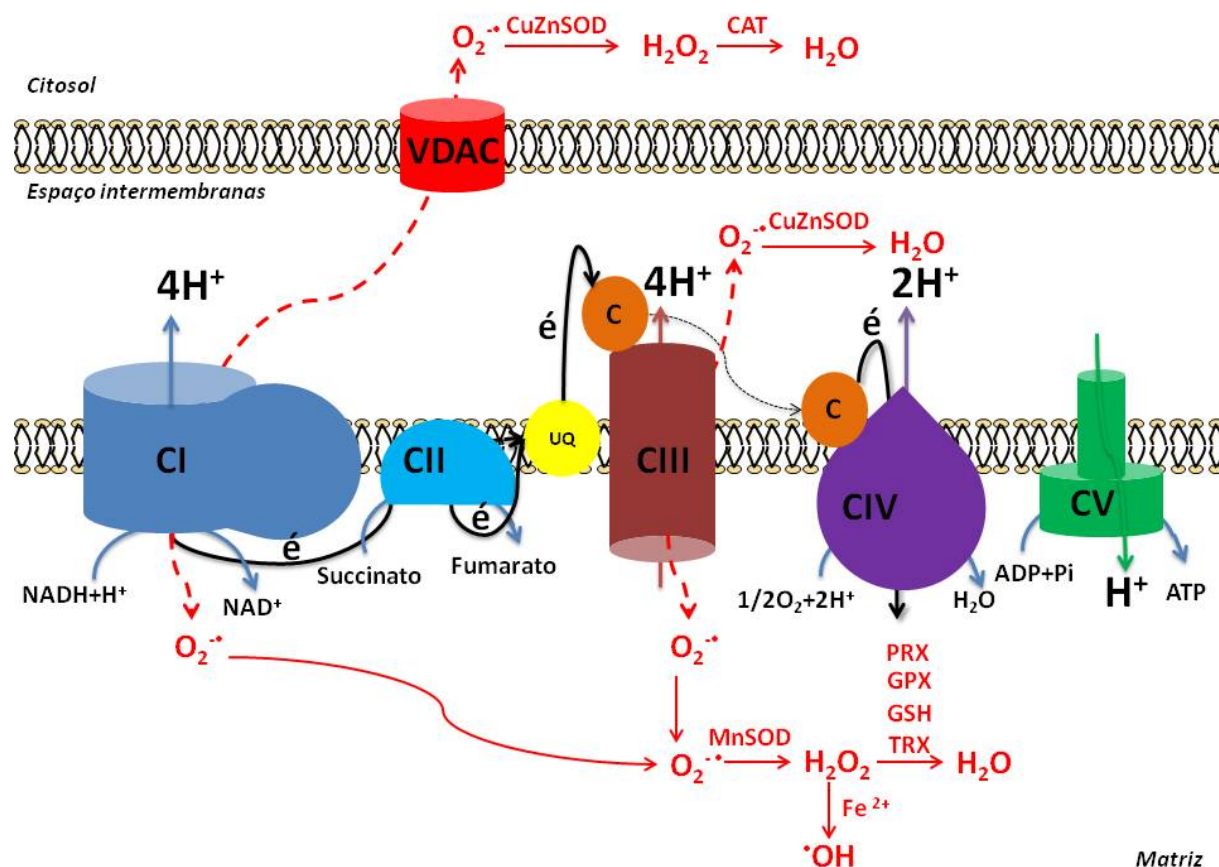
Sabe-se que em algumas linhagens de células tumorais, os níveis ROS são elevados (YIN *et al.*, 2004; MORENO-SANCHEZ *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2011; INDRAN *et al.*, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2012b), o que promove danos no DNA e instabilidade cromossomal, favorecendo ainda mais a progressão do câncer, associada a disfunções metabólicas, sinalização celular comprometida e atividade oncogênica (YANG *et al.*, 2013). Para as células HepG2, por exemplo, sabe-se que uma mutação pontual (gene ND6) no complexo I (NADH desidrogenase), que resulta no comprometimento da respiração mitocondrial, promove um importante aumento nos níveis de ROS, mais especificamente de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$ . Como consequência da mutação do complexo I, observa-se uma diminuição da eficiência da fosforilação oxidativa, contribuindo para a tumorigênese, além de promover o aumento da oxidação do DNA e proteínas (YIN *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2011).

Ainda neste contexto, disfunções na capacidade antioxidante são descritas para alguns tipos de cânceres. A expressão e atividade da SOD e da catalase, por exemplo, foram



reduzidas em alguns modelos tumorais, sugerindo que ROS, mais especificamente,  $H_2O_2$ , não são removidos de forma eficiente (YANG *et al.*, 2013; ZEPEDA *et al.*, 2013). Além disso, a capacidade antioxidante varia de acordo com o tipo de linhagem tumoral sendo possível que as células tumorais possam se adaptar a níveis elevados de ROS (GALLUZZI *et al.*, 2012b).

FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA MITOCÔNDRIA E SUAS DEFESAS ANTIOXIDANTES



FONTE: Adaptado de SABHARWAL e SCHUMACKER (2014) com autorização de *Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center* (número da licença: 4104350221545).

NOTA: Elétrons derivados a partir da oxidação de metabólitos intermediários podem levar a geração de ROS em sítios específicos da cadeia respiratória mitocondrial. A transferência de um único elétron para o  $O_2$  pode gerar o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) o qual é convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase na matriz mitocondrial (MnSOD) ou no espaço intermembranar (CuZn-SOD). O  $H_2O_2$  é degradado na matriz pela glutathione peroxidase (GPX) ou pelas peroxiredoxinas (PRX) utilizando equivalentes redutores obtidos da oxidação da glutathione reduzida (GSH). O  $H_2O_2$  gerado na matriz pode oxidar proteínas, lipídios e/ou mtDNA (DNA mitocondrial). Proteínas oxidadas podem ser reparadas pela ação das tioredoxinas (TRX). A remoção de ROS pode depender da quantidade de GSH que é mantida pela disponibilidade de NADPH.  $H_2O_2$  pode ser encontrado no espaço intermembranar e também no citosol quando a uma excessiva geração de ROS ou quando os mecanismos de defesa antioxidantes não são suficientes. Os complexos I (CI), II (CII) e III (CIII) são capazes de gerarem ROS na matriz mitocondrial.  $O_2^{\bullet-}$  é liberado no espaço intermembranar pelo CIII é devido à geração da ubisemiquinona do CIII.

## 4.4 MORTE CELULAR

### 4.4.1 Apoptose

Para o desenvolvimento de terapias eficientes contra o câncer é essencial que se conheçam as vias de morte celular, uma vez que nas células tumorais este processo é considerado ineficiente (SUN; PENG, 2009; FULDA *et al.*, 2010).

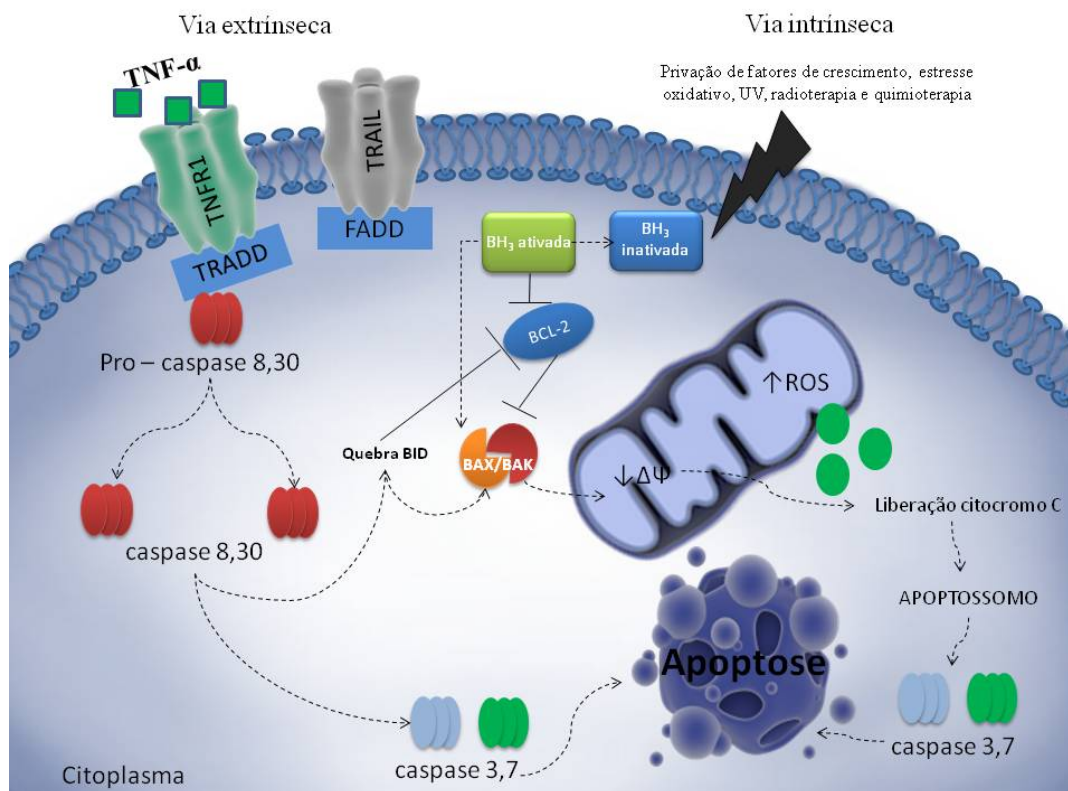
As vias de morte celular como apoptose, necrose, morte autofágica, anoikis e necroptose podem ser identificadas com base no aspecto morfológico das células (KROEMER *et al.*, 2009; TAIT *et al.*, 2014). A apoptose é caracterizada pela condensação da cromatina, condensação do citoplasma, fragmentação nuclear, *blebbing* da membrana e fragmentação celular em corpos apoptóticos (KROEMER *et al.*, 2009; SUN; PENG, 2009; INDRAN *et al.*, 2011). A apoptose pode ocorrer por duas vias: a extrínseca e a intrínseca, sendo que esta última é mediada pela mitocôndria e evidências sugerem que esses dois processos podem ser interligados (SUN; PENG, 2009; SAROSIEK *et al.*, 2017). A via extrínseca da apoptose é desencadeada pela ligação de sinais de morte a receptores de membrana e a via intrínseca pela liberação de moléculas pro-apoptóticas da mitocôndria, como o citocromo c (SUN; PENG, 2009; SAROSIEK *et al.*, 2017).

A via extrínseca pode ser ativada pelo fator de necrose tumoral alfa 1 (TNF-1 $\alpha$ ), pertencente à família de receptores de citocinas, e possui um papel importante na homeostase celular, principalmente em relação à resposta imune. TNF-1 $\alpha$  se liga a um receptor de superfície celular (TRAIL) desencadeando a clivagem e ativação de caspases 8 que por sua vez induz a clivagem e ativação de caspases efetoras do processo apoptótico (FIGURA 9). A via intrínseca, por sua vez, tem como principais reguladores a família das proteínas BCL-2 (INDRAN *et al.*, 2011; GREEN, 2017). Foram reportados mais de 20 membros da família BCL-2, os quais podem ser classificados como fatores pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, Bim e dentre outros) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1). As proteínas pro e anti-apoptóticas interagem entre si impedindo que ocorra a formação de complexos na mitocôndria não ocorrendo à liberação de moléculas mitocondriais como o citocromo c (YOULE; STRASSER, 2008; SUN; PENG, 2009).

A via intrínseca da apoptose pode ser desencadeada por diversos fatores como por exemplo, aumento dos níveis de ROS, redução do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e aumento dos níveis de Ca<sup>2+</sup>. O comprometimento da fosforilação oxidativa gera alterações no  $\Delta\Psi_m$  promovendo a liberação de proteínas pro-apoptóticas que estão associadas

à membrana mitocondrial, levando a liberação de citocromo c e ativação das caspases (FIGURA 9) (YOULE; STRASSER, 2008).

FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTANDO AS VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DA APOPTOSE



FONTE: Adaptado de YOULE e STRASSER (2008) com autorização de *Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center* (número da licença: 4047280609077).

NOTA: A apoptose pode ser induzida por ligantes de membrana, como TNF-1 $\alpha$  (via extrínseca), ou por vários fatores como privação de fatores de crescimento, estresse, radiação UV e dentre outras (via intrínseca). A via intrínseca inicia-se pela ativação das proteínas BH3 que resulta na inativação de alguns membros da família BCL-2 que auxilia a ativação de BAX e BAK, que por sua vez promovem a apoptose. Uma vez ativados BAX e BAK promovem a liberação do citocromo c levando a ativação de caspases, como a caspase 3 culminando para a apoptose. A via extrínseca pode ignorar o passo mitocondrial e ativar a caspase 8 diretamente, o que conduz à ativação da caspase 3. A família BCL-2 regula a via intrínseca e pode modular a via extrínseca quando a clivagem da BID se comunica entre as duas vias.

Em células tumorais existem indícios de que as proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, estão altamente expressas e isto têm sido associado com a resistência a apoptose. A regulação positiva de Bcl-2 e Bcl-xL está associada a um mau prognóstico no câncer. A capacidade dessas proteínas em inibir proteínas pro-apoptóticas como Bax e Bak, tem sido o principal mecanismo pelo qual estas células adquirem resistência a apoptose (INDRAN *et al.*, 2011; GREEN, 2017).

#### 4.4.2 Autofagia

A autofagia é definida como um mecanismo que captura e recicla proteínas intracelulares e organelas, como mitocôndrias, no interior dos lisossomos. É um processo essencial por apresentar um papel crítico na manutenção da homeostase celular em condições de crescimento normal e na preservação da viabilidade celular em condições de estresse, podendo ser considerada um processo em que a célula se “auto” degrada (FIGURA 10) (MATHEW; WHITE, 2011; LEE *et al.*, 2015; WHITE, 2015).

O prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2016, o Yoshinori Ohsumi, descreveu os mecanismos envolvidos na autofagia (VAN NOORDEN; LEDFORD, 2016). Ohsumi, durante os anos 90 em estudos com *Saccharomyces cerevisiae*, identificou diversos genes ATGs (*autophagy-related genes*), relacionados aos mecanismos pelos quais as células destroem seus próprios componentes. Mecanismos similares também foram observados em células de mamíferos e, muitas vezes, estão associados a diversas doenças, entre estas, o câncer (TAKESHIGE *et al.*, 1992; VAN NOORDEN; LEDFORD, 2016).

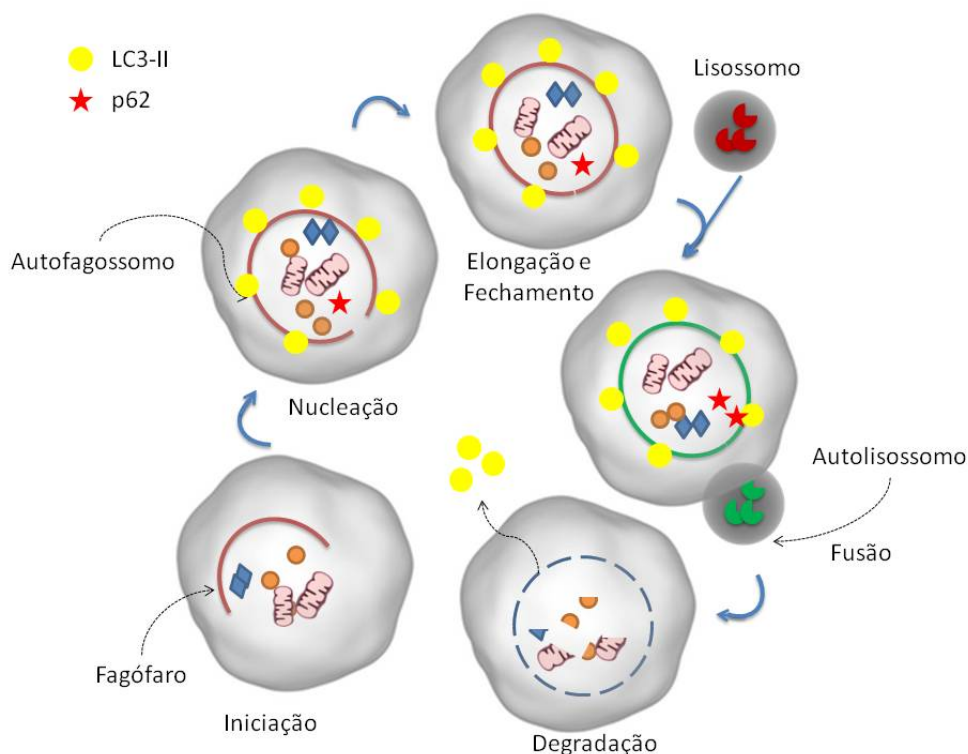
Existem diferentes tipos de autofagia, que compreendem desde a macroautofagia não seletiva até a autofagia seletiva as quais abrangem: a autofagia mediada por chaperonas, macroautofagia, microautofagia e a mitofagia. No caso da autofagia mediada por chaperonas, existem proteínas alvo específicas contendo uma determinada sequência (KFERQ) na membrana do lisossomo, por outro lado, a microautofagia realiza o engolfamento direto do citoplasma na superfície do lisossomo por invaginação da membrana lisossomal (EDINGER; THOMPSON, 2004; LEE *et al.*, 2015). Em contraste, a macroautofagia (autofagia) é mediada pelo autofagossomo, o qual é responsável no englobamento de organelas, proteínas e lipídios danificados em uma vesícula com dupla membrana. Em seguida, o autofagossomo se funde com o lisossomo, formando uma membrana única onde os componentes são degradados pelas hidrolases lisossomais (FIGURA 10) (MAES *et al.*, 2013).

O papel da autofagia no câncer é complexo, podendo relacionar-se tanto com a progressão assim como com a supressão tumoral. A ativação da autofagia se deve pelas condições fisiológicas, tais como inanição de nutrientes, hipóxia, estresse metabólico e em resposta a certos tipos de compostos e radiação (EDINGER; THOMPSON, 2004; LOZY; KARANTZA, 2012; WHITE, 2015). O processo autofágico gera precursores permitindo que as células adaptem seu metabolismo à demanda de energia. Além disso, alterações em qualquer etapa desse processo irão resultar no acúmulo de proteínas danificadas e/ou danos no

genoma que podem estimular ainda mais o desenvolvimento do câncer (ROSENFELDT; RYAN, 2011).

Em relação à progressão do tumor, a autofagia está vinculada ao estresse oxidativo, danos ao DNA, instabilidade genômica e persistência a inflamação, permitindo a sobrevivência da célula tumoral e provavelmente contribuindo para a resistência a certos tipos de tratamento (EDINGER; THOMPSON, 2004; LOZY; KARANTZA, 2012; WHITE, 2015). Já em relação a supressão tumoral, o papel da autofagia foi relacionado a remoção de organelas, como as mitocôndrias, e proteínas danificadas, resultantes da alteração do metabolismo em função do estresse oxidativo de algumas células tumorais, que podem ser ocasionados por condições adversas como certos tratamentos anticâncer (AZAD *et al.*, 2009; BELLOT *et al.*, 2013). A compreensão da regulação da autofagia e seu impacto sobre os resultados ao tratamento em alguns tipos de cânceres permitem identificar novos alvos terapêuticos (MAES *et al.*, 2013). Tem sido proposto que a indução da autofagia em algumas linhagens celulares pode direcionar as células a morte, aumentando assim a eficácia do tratamento (EDINGER; THOMPSON, 2004).

FIGURA 10 - ESQUEMA REPRESENTANDO O PROCESSO AUTOFÁGICO



FONTE: Adaptado de KONDO *et al* (2005) com autorização de *Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center* (número da licença: 4061000153798)

NOTA: Condições como privação de nutriente, infecção por certos patógenos e/ou compostos que levam ao estresse induzem a autofagia. O processo da autofagia inicia-se pela formação de uma membrana dupla dentro da célula (fagóforo) que por sua vez, se alonga e a proteína associada ao microtúbulo (LC3) é então recrutada para

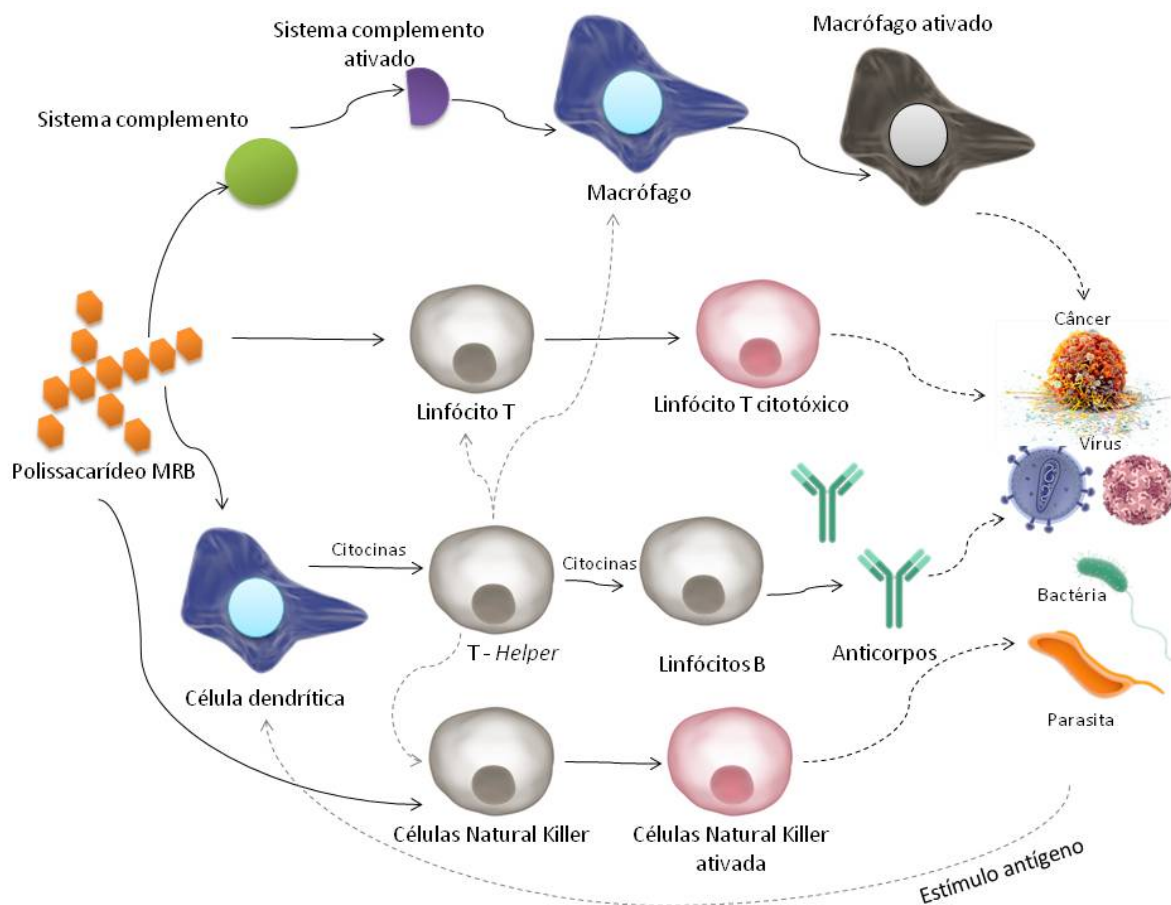
se ligar a membrana. Nessa etapa é formado o autofagossomo que sequestra proteínas e organelas como a mitocôndria. O autofagossomo se funde ao lisossomo (que contém hidrolases) e se torna autolisossomo, também conhecido como vacúolos degradativos autofágicos. Uma forma de monitorar a autofagia é pela detecção da proteína LC3-II que é acumulada nos autofagossomos e pela não detecção da proteína p62 que é degradada no processo autofágico.

#### 4.5 AÇÃO ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS

Considerados à classe mais abundante de biomoléculas, os polissacarídeos surgiram como uma classe essencial de produtos naturais bioativos, uma vez que apresentam importantes efeitos biológicos, como: antibióticos (GUO *et al.*, 2004; FRIEDMAN, 2016); antioxidantes (HUANG *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2016); anticoagulantes (FAGGIO *et al.*, 2016; USTYUZHANINA *et al.*, 2016); antiviral (ZHAO *et al.*, 2016); leishmanicida (AMARAL *et al.*, 2015; KOTHANDARAMAN *et al.*, 2017); imunomodulatória (HUANG *et al.*, 2016) e; antitumoral (ZONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015a). Devido a esta ampla habilidade esses biopolímeros foram classificados como modificadores de resposta biológica (MRB) (BOHN; BEMILLER, 1995; CALABRESI; GAMUCCI, 1995; LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Os biopolímeros considerados MRB são capazes de modular a resposta imune inata pela ativação de macrófagos resultando em diversos efeitos benéficos ao organismo, como por exemplo, a geração de mecanismos de defesa como citotoxicidade microbiana e tumoricida (FIGURA 11) (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).



FIGURA 11 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS IMUNES PARA A DESTRUIÇÃO DE PATÓGENOS POR POLISSACARÍDEOS MRB



FONTE: Adaptado de LEUNG *et al* (2006) com autorização da Elsevier and Copyright Clearance Center (número da licença: 4035990822953).

NOTA: Polissacarídeos MRB podem ativar o sistema complemento, macrófagos, linfócitos-T, linfócitos-B e células *natural killer*. A ativação das células *natural killer* pode ser indiretamente através de células dendríticas acessórias e macrófagos. O polissacarídeo MRB pode estimular as células dendríticas acessórias a secretar citocinas, como a interleucina-1 (IL-1), as quais estimulam os linfócitos – T *helper* a secretar mais citocinas, que por sua vez estimulam a ativação de macrófagos, linfócitos – T, linfócitos – B e células *natural killer* a suprimir certos patógenos e até mesmo células tumorais.

Em relação à atividade antitumoral, um dos estudos pioneiros com polissacarídeos foi realizado em 1946 por Nauts e colaboradores (NAUTS *et al.*, 1946; ZONG *et al.*, 2012), no qual se verificou que certos polissacarídeos isolados de toxinas de bactérias *Serratia marcescens* (*B. prodigiousus*) induziram a remissão completa de um tipo de carcinoma em pacientes. Os principais efeitos observados incluíram alívio da dor, melhora do apetite e do sono, estímulo na cicatrização de feridas, e a regeneração de ossos. A partir de então, uma série de estudos têm sido desenvolvidos, motivados pela baixa toxicidade apresentada por estes biopolímeros (JOSEPH *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2015; JOSEPH *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015a; YU *et al.*, 2017).

Embora os efeitos antitumorais de certos polissacarídeos sejam evidentes e comprovados, os mecanismos de ação ainda não estão totalmente compreendidos. Diante dos

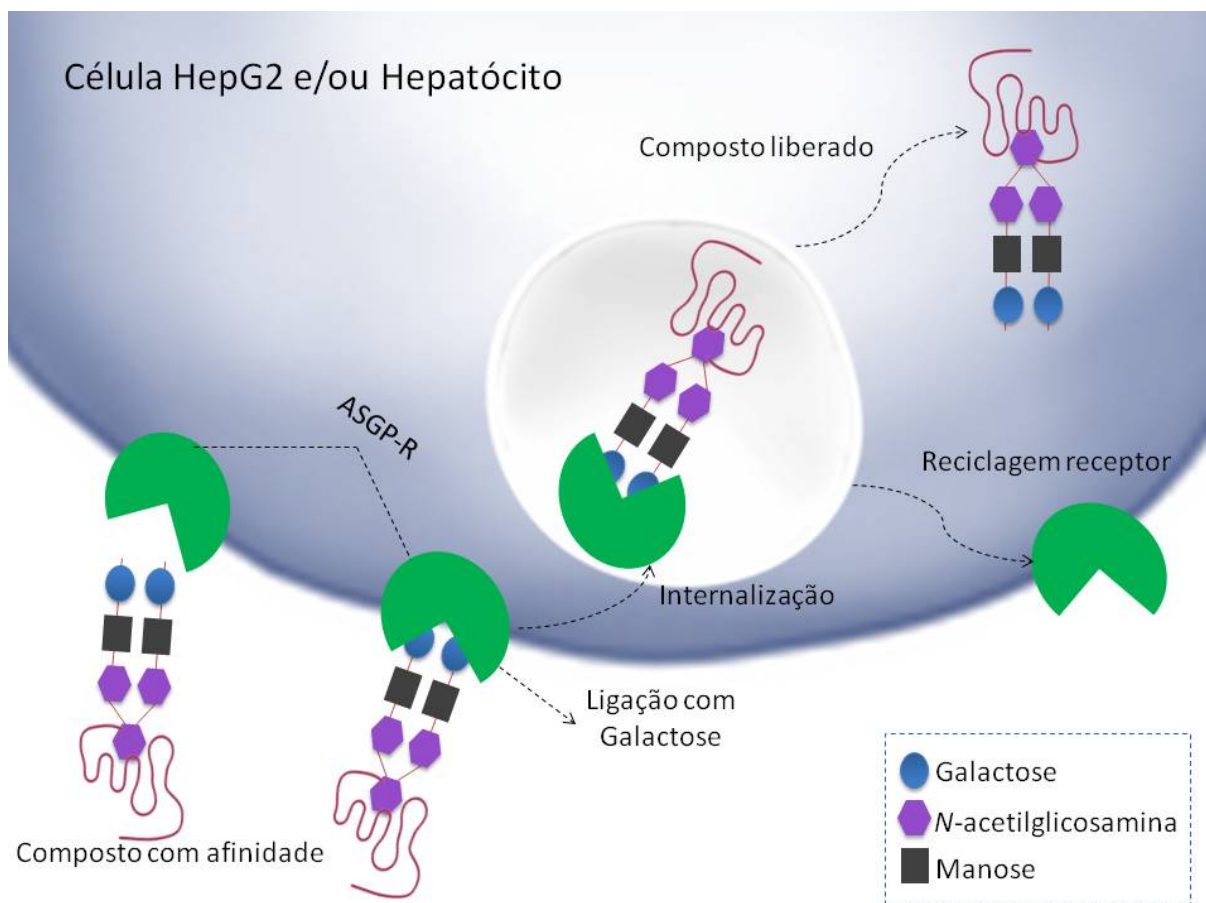
efeitos já descritos tem sido proposto que os polissacarídeos inibem o crescimento do tumor por meio de um ou mais dos seguintes mecanismos: 1) prevenção da tumorigênese pela ingestão oral de preparações ativas; 2) atividade citotóxica direta, como a indução da morte celular por apoptose e autofagia (PARK *et al.*, 2011); 3) imunoestimulação em combinação com quimioterapia e 4) inibição de metástase (ZONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015a).

Muitos destes efeitos sugerem que os polissacarídeos seriam internalizados, porém estudos para elucidar como estes biopolímeros conseguem penetrar em células tumorais, são escassos (PRIGENT-RICHARD *et al.*, 1998; KANEO *et al.*, 2001; PETERSZEGI *et al.*, 2003; LAI *et al.*, 2010). A existência de receptores de asialoglicoproteínas (ASGP-R) em hepatócitos e células HepG2, que reconhecem ligantes contendo manose, galactose e *N*-acetilglicosaminas (LEPENIES *et al.*, 2013) são sítios de ligação para biopolímeros contendo as unidades monoméricas citadas (FIGURA 12). É proposto que após a ligação de biopolímeros ao ASGP-R resulte na internalização destes ligantes que podem ser glicoproteínas ou polissacarídeos via endocitose, que ao entrar nas células estas moléculas podem desencadear uma série de efeitos (KANEO *et al.*, 2001; LAI *et al.*, 2010).

Em 2010, Lai e colaboradores, avaliaram os efeitos dos corantes fluorescentes Cy3 e alguns derivados de galactose, ligados a superfícies de nano partículas magnéticas (MNPs) em células HepG2. Os autores observaram que os MNPs interagiram com o receptor ASGP-R na superfície celular, com subsequente internalização por endocitose. Péterszegi *et al.* (2003), avaliaram a interação de oligos e polissacarídeos, contendo galactose, ácido galacturônico e fucose em fibroblastos de pele humana. Os autores demonstraram que polissacarídeos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) possuem dois sítios de interação com os fibroblastos, a membrana plasmática e o núcleo, confirmando a hipótese de que polissacarídeos com estas características se ligam a membrana plasmática e também podem ser internalizados.



FIGURA 12 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA INTERAÇÃO DO RECEPTOR ASGPR COM COMPOSTOS CONTENDO GALACTOSE E MANOSE



FONTE: O autor (2017).

NOTA: ASGP-R são receptores de lectina encontrados na superfície de células hepáticas ( $\sim 1 - 5 \times 10^5$  ASGP-R/célula). Compostos contendo em sua estrutura *N*-acetilglicosamina, manose e/ou galactose interagem com os receptores e então são internalizados via endocitose para as células e liberados para desencadear uma série de efeitos dentro em particular, efeitos citotóxicos.

Tendo em vista que os ASGP-R são expressos em grande quantidade na superfície de hepatócitos e células HepG2, estes receptores vêm sendo estudados como alvo para a ligação de compostos com potencial terapêutico. Um agente quimioterápico complexado com ligantes que sejam reconhecidos pelos receptores ASGP-R, como certos polissacarídeos, poderia ser internalizado por endocitose nas células HepG2 (KNEO et al., 2001; LAI et al., 2010).

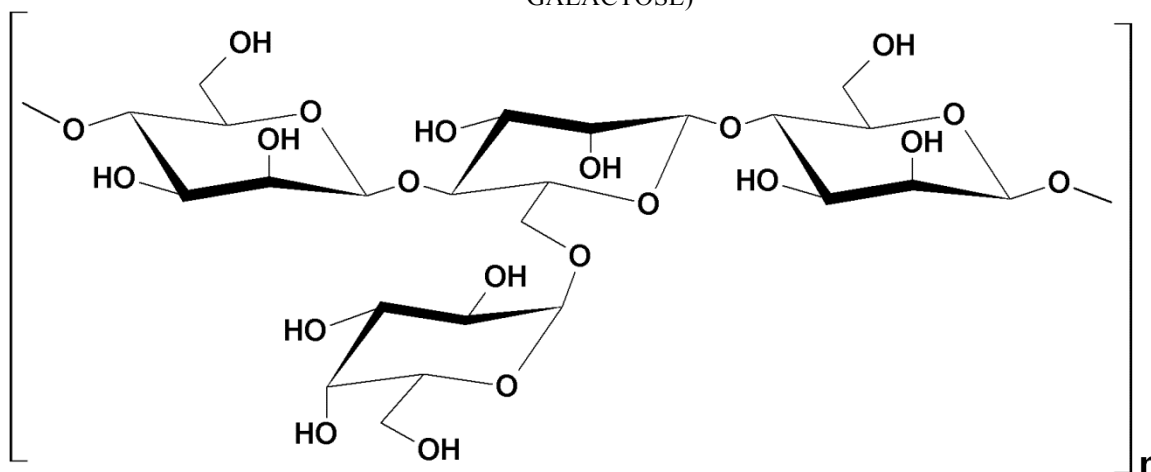
Em geral, os diferentes efeitos observados para os polissacarídeos, incluindo atividade antitumoral indicam que a atividade biológica destes biopolímeros está diretamente relacionada com as características estruturais (LIU et al., 2015a). Deste modo, a correlação entre a estrutura química e a atividade biológica de polissacarídeos tem sido investigada (LIU et al., 2015a). Alguns estudos têm mostrado que os fatores mais importantes para atividade dos polissacarídeos são: a distribuição de unidades glicosídicas ao longo da cadeia principal

(MISAKI, 1993); a massa molecular (KULICKE *et al.*, 1997); a conformação molecular (BOHN; BEMILLER, 1995) que pode ocorrer em estruturas altamente ordenadas, tais como triplas-hélices (PAULSEN, 2001; PAULSEN, 2002), o grau de substituição do polissacarídeo (BLASCHEK *et al.*, 1992), ou a presença de diferentes grupos substituintes como, por exemplo, a complexação com metais (BARAN, 2009).

#### 4.5.1 Galactomananas e suas aplicações biológicas

Galactomananas de espécies vegetais são encontradas em sementes e atuam como polissacarídeos estruturais e de reserva. As sementes são consideradas fontes renováveis, uma vez que, não ocorre a destruição da árvore. Quanto as suas características químicas gerais, as galactomananas são polissacarídeos neutros, hidrossolúveis e heterogêneos. Geralmente, esses biopolímeros possuem uma cadeia principal de unidades de D-manopiranoses que são unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com ramificações de unidades de D-galactopiranoses unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (FIGURA 13) (DEA; MORRISON, 1975; GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

FIGURA 13 - ESTRUTURA DE UMA GALACTOMANANA DE RAZÃO DE 3:1 (MANOSE: GALACTOSE)



Fonte: O autor (2017).

Nota: Estrutura proposta para uma galactomanana de razão Man:Gal 3:1. Unidades da cadeia principal são representadas por D-manopiranoses e unidades da cadeia lateral representada por D-galactopiranoses.

A razão manose:galactose (Man:Gal) varia de acordo com a espécie vegetal, assim como, a metodologia empregada para a extração da galactomanana (GANTER *et al.*, 1995; RAMESH *et al.*, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2011). Galactomananas podem ser obtidas facilmente das sementes por extração aquosa seguida de precipitação com etanol. Após

solubilização em água e secagem, normalmente o material obtido apresenta aspecto de algodão macio e branco (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). O rendimento do biopolímero pode ser superior a 30% em relação à massa seca das sementes (GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

As galactomananas utilizadas comercialmente são extraídas das sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.) que apresentam uma razão Man:Gal de 1,5:1; alfarroba (*Ceratonia siliqua*) com Man:Gal 3,5:1 e goma tara (*Caesalpinia spinosa* L.) com Man:Gal 3,0:1 (ROBINSON *et al.*, 1982; YOON *et al.*, 2008; MUDGIL *et al.*, 2014). As aplicações na indústria para as galactomananas podem ser diversas, como por exemplo, nas indústrias farmacêuticas, alimentícia, cosmética e do papel (GARTI; REICHMAN, 1994; GARTI *et al.*, 1997; HARTMANS *et al.*, 2003; SITTIKIYOTHIN *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que galactomananas de diferentes fontes, nativas e modificadas, exibiram diversos efeitos como modificadores de resposta biológica incluindo atividade antitumoral (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2006; NOLETO *et al.*, 2009; CUNHA, 2013; JOSEPH *et al.*, 2013), ativação do sistema imune (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007; ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015) ação leishmanicida (ADRIAZOLA *et al.*, 2014), antiviral (ONO *et al.*, 2003), antitrombótica e anticoagulante (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado com galactomananas extraídas de *Caesalpinia spinosa* (SANTANDER *et al.*, 2011) foi demonstrado que esses biopolímeros foram capazes de estimular a maturação de monócitos humanos (MDDCs) com aumento na expressão de CD83, DC86E e CD206, além de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, e TNF- $\alpha$ ) e células dendríticas (DC) o que está relacionado com a ativação do sistema imune, particularmente à indução de uma resposta antitumoral. Ainda neste contexto, outros autores avaliaram a atividade imunomoduladora de galactomananas extraídas de sementes de *Trigonella foenum-graecum*, este estudo demonstrou que o polímero foi eficaz de aumentar atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos, além de promover a proliferação de células HB4C5, as quais são responsáveis em produzir anticorpos monoclonais contra o câncer de pulmão (RAMESH *et al.*, 2002).

Alguns estudos apontam que a modificação química de galactomananas pode fornecer derivados com efeitos diferenciados (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007; CHRESTANI *et al.*, 2009; CUNHA, 2013; MOURA NETO *et al.*, 2014). Preparações nativa e parcialmente hidrolisada de galactomananas isoladas de *M. scabrella*, quando complexadas com oxovanádio (IV/V) inibiram em ~ 60% a proliferação de células HeLa em concentração 10

vezes menor a das galactomananas não complexadas, sugerindo que a presença do metal é um fator importante em relação aos efeitos citotóxicos observados (NOLETO *et al.*, 2009).

No presente trabalho, as galactomananas foram extraídas das sementes de *S. amazonicum*, uma árvore da família Leguminosae, endêmica da região norte a qual é popularmente conhecida como: paricá-da-amazônia, paricá-da-terra-firme, pinho-cuiabano, faveira, paricá, paricá-grande e bandarra (CARVALHO, 2007). Estudos anteriores em relação ao isolamento e caracterização das galactomananas das sementes de *S. amazonicum* já foram realizados (GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 2001), e pela primeira vez em 2013, estas foram isoladas e modificadas quimicamente pelo processo da sulfatação química por Cunha (2013). Neste estudo verificou-se que ambas as galactomananas (nativa e modificada quimicamente) apresentaram efeitos citotóxicos em células HepG2, evidenciados pela diminuição na viabilidade celular e alterações no metabolismo energético. Os biopolímeros nativos e quimicamente modificados promoveram diminuição do consumo de oxigênio e na produção de piruvato com concomitante aumento nos níveis de lactato, quando avaliados em células intactas. Esses resultados sugerem que os biopolímeros podem ter sido internalizados nestas células e apontam a mitocôndria como seu possível alvo de ação. A interferência das galactomananas no metabolismo energético das células HepG2 e os efeitos citotóxicos para células HeLa e *Leishmania* previamente obtidos para os complexos de galactomananas com oxovanádio (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015) motivaram a realizar modificações químicas através da hidrólise ácida parcial da galactomanana e complexar as preparações destes biopolímeros com oxovanádio (IV/V) para investigar os efeitos destas preparações em células de hepatocarcinoma humano.

#### 4.6 VANÁDIO E SUA APLICAÇÃO BIOLÓGICA

Em meados de 1830 o químico sueco Nils Sefstrom, apresentou ao mundo o metal de transição vanádio que é considerado o 18º elemento mais abundante na crosta terrestre. O vanádio se tornou objeto de interesse pelos nutricionistas desde a sua descoberta em várias espécies marinhas, como as ascídias e mariscos, e estas têm este metal como um elemento essencial (BARCELOUX; BARCELOUX, 1999; THOMPSON *et al.*, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 2004; COSTA PESSOA *et al.*, 2015; PESSOA *et al.*, 2015).

Além das espécies marinhas, o vanádio pode ser encontrado em pequenas quantidades em alguns alimentos como, por exemplo, cogumelos comestíveis, pimenta preta, salsa, cereais

e frutas (BARCELOUX; BARCELOUX, 1999; YOSHINAGA *et al.*, 2006; BISHAYEE *et al.*, 2010; REHDER, 2016). Nos organismos, o vanádio é capaz de entrar por intermédio da inalação, trato gastrointestinal e pele podendo ser estocado em órgãos como fígado, rins e ossos (BRACKEN *et al.*, 1985; MUKHERJEE *et al.*, 2004; BISHAYEE *et al.*, 2010).

O vanádio pode ser encontrado em seis estados de oxidação, sendo os estados IV e V de maior importância biológica. Uma característica importante do vanádio é a capacidade de existir como oxocátions, representado pelo vanadil (IV) e oxoânions sendo o principal representante o vanadato (V) (EVANGELOU, 2002; KORDOWIAK *et al.*, 2007; BISHAYEE *et al.*, 2010; KORBECKI *et al.*, 2012; REHDER, 2016). Nos sistemas biológicos a redução de vanádio V para IV ocorre pela ação de agentes redutores como, por exemplo, a glutatona, ácido ascórbico, NADPH e cisteína (MACARA *et al.*, 1980; BISHAYEE; CHATTERJEE, 1995; BARAN, 2000; YOSHINAGA *et al.*, 2006). No sangue, os íons de vanadil são transportados principalmente pela transferrina, (HARRIS, 1985) (THOMPSON; ORVIG, 2006) e então, são rapidamente incorporados nos tecidos (MUKHERJEE *et al.*, 2004).

Acredita-se que os compostos de vanádio V (metavanadatos ou ortovanadatos) entram nas células através de canais aniônicos enquanto que os compostos no estado IV (cátions de vanadil  $\text{VO}^{2+}$ ) podem permear as membranas celulares por difusão (FIGURA 14) (BRACKEN *et al.*, 1985; THOMPSON *et al.*, 1999; THOMPSON *et al.*, 2009; KORBECKI *et al.*, 2012).

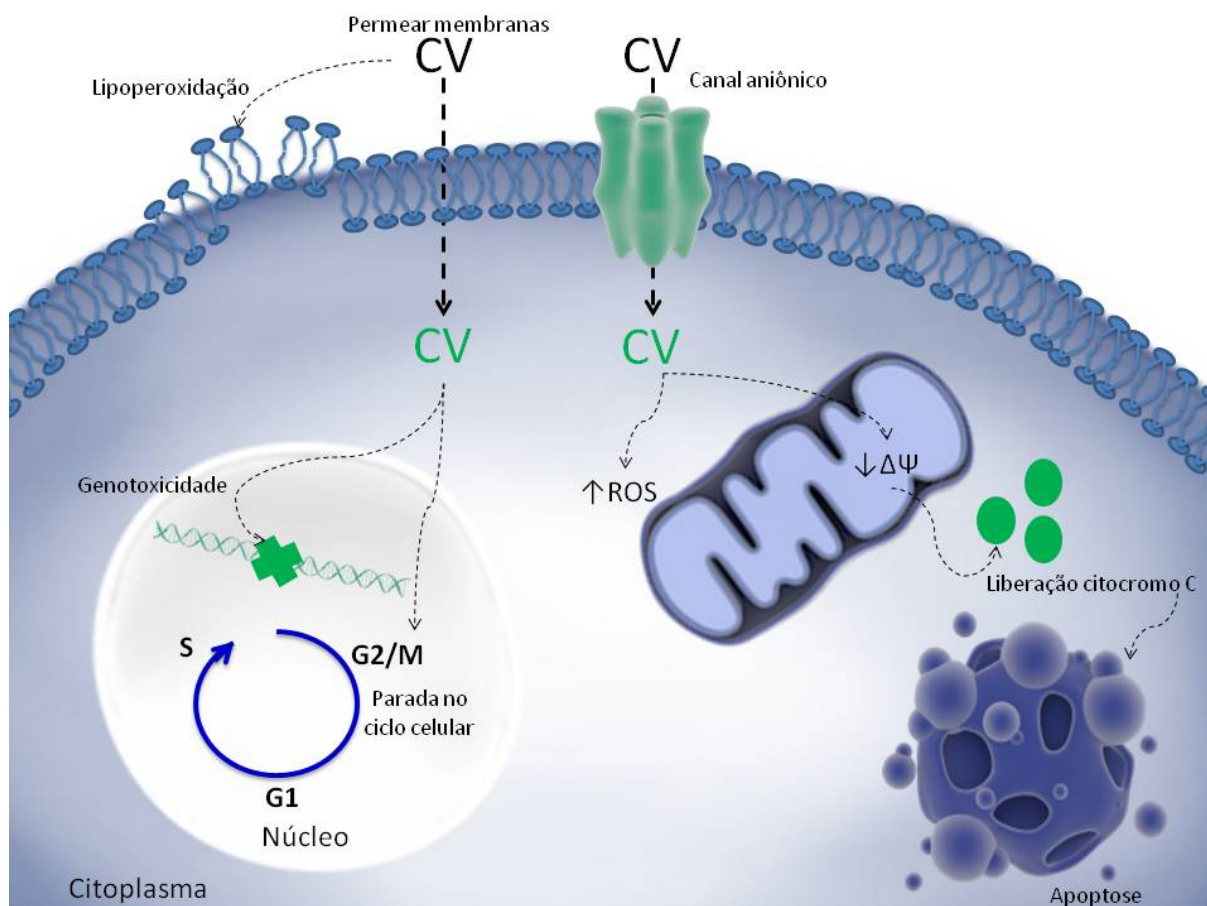
Alguns pesquisadores demonstraram que o vanadato e o fosfato participam de reações muito semelhantes, uma vez que o vanadato estruturalmente é muito similar ao fosfato, tornando-se um inibidor competitivo de enzimas que utilizam fosfato como substrato. Consequentemente, o vanádio e seus compostos são eficazes na inibição de diferentes proteínas como as fosfatases (fosfatase alcalina, fosfatase ácida e tirosinas-fosfatases) e ribonucleases (WANG *et al.*, 2010; COSTA PESSOA *et al.*, 2015; KIOSEOGLOU *et al.*, 2015; PESSOA *et al.*, 2015).

Estudos indicam que a inibição de fosfatases pelo vanádio está relacionada com a participação da regulação das funções de segundos mensageiros e modulação de uma bateria de genes (BISHAYEE *et al.*, 2010; STRIANESE *et al.*, 2013). Uma das principais propriedades farmacológica já conhecida é a ação insulina-mimética (THOMPSON *et al.*, 1999; THOMPSON; ORVIG, 2006). A função insulina-mimética se deve à inibição de proteínas tirosinas fosfatases, ou pela ação direta no receptor de insulina (YANG, 2003; CRANS *et al.*, 2004).

Outros efeitos têm sido descritos para vários compostos de vanádio (CRANS *et al.*, 2000; SAKURAI *et al.*, 2003; SRIVASTAVA; MEHDI, 2005; JIANG *et al.*, 2016) como atividade imunomoduladora (ADRIAZOLA *et al.*, 2014; ASHIQ *et al.*, 2014), atividade leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002; ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015; CHRISTENSEN *et al.*, 2016), anti-hiperlipidêmica, antiobesidade, anti-hipertensiva, (MUKHERJEE *et al.*, 2004) e atividade antitumoral (EVANGELOU, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; ABAKUMOVA *et al.*, 2012; GRUZEWSKA *et al.*, 2014; LEÓN *et al.*, 2014).

No que diz respeito à atividade antitumoral (FIGURA 14), certos compostos de vanádio (sais de vanádio ou na forma de complexos com ligantes orgânicos), têm apresentado toxicidade em diferentes linhagens celulares (EVANGELOU, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; STRIANESE *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014). Embora o mecanismo de ação ainda não esteja bem compreendido, estes compostos já apresentaram efeitos em relação à inibição da síntese de DNA e RNA (EVANGELOU, 2002), aumento de ROS (WANG *et al.*, 2010), parada no ciclo celular, mas especificamente na fase G2/M (RAY *et al.*, 2006; STRIANESE *et al.*, 2013), morte celular por apoptose (STRIANESE *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014) e inibição da autofagia (WU *et al.*, 2014).

FIGURA 14 – EFEITOS ANTITUMORAIS OBSERVADOS POR COMPOSTOS COM VANÁDIO



FONTE: o Autor (2017).

NOTA: Já foram descritas na literatura diversas atividades biológicas observadas por compostos de vanádio, uma delas, é a atividade antitumoral exercida por estes. Existem relatos que esses compostos de vanádio (CV), podem permeiar as membranas das células (vanadil) ou até mesmo entrar via canal aniônico (vanadato). Após os CV entrarem nas células, estes podem desencadear uma série de efeitos citotóxicos, dentre os efeitos, destacam-se: genotoxicidade, parada no ciclo celular (fase G2/M), aumentos de ROS, diminuição do potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), levando a liberação do citocromo c e posteriormente a morte celular por apoptose. Além disso, CV pode levar a peroxidação lipídica das células.

A maioria dos estudos com vanádio visando aplicação biológica é realizada com este metal complexado com ligantes orgânicos. Compostos orgânicos complexados com vanádio facilitam as ações farmacológicas deste metal comparado aos sais de vanádio simples (GOLDWASER *et al.*, 2000; WOJCIECH DABROS, 2007). Entre as vantagens estão o aumento da lipofilicidade do vanádio, o que facilita a sua absorção intestinal, além de diminuir as doses de vanádio necessárias para produzir efeitos biológicos satisfatórios (MCNEILL *et al.*, 1992). Neste sentido, a síntese de complexos de vanádio com diferentes ligantes que detêm múltiplos grupos doadores (carboxilados) é de interesse considerável na bioquímica do vanádio e em relação às suas potenciais aplicações terapêuticas (GYURCSIK; NAGY, 2000; BARAN, 2001; BARAN, 2009).

Em um estudo realizado com complexos de vanádio com derivados de piridoxina (piridoxilideneiminato – vanádio IV), foi verificado que os complexos apresentaram uma melhor seletividade para as células tumorais (células de adenocarcinoma de pulmão) em relação às células não tumorais (queratinócitos) (STRIANESE *et al.*, 2013). Os efeitos citotóxicos observados por esses autores incluíram indução da morte celular pelo aumento de ROS, seguida pela despolarização da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) sugerindo as mitocôndrias como o alvo de ação destes compostos.

Ainda nesse contexto, Zhang e colaboradores (2013), avaliaram dois complexos de oxovanádio (complexos de vanádio de bases de Schiff) em diferentes linhagens de hepatoma humano (BEL-7402, HUH-7 e HepG2). Os resultados mostraram que ambos os complexos exerceram uma importante redução na proliferação celular, representada pela parada no ciclo celular na fase G0/G1 e também uma diminuição significativa no  $\Delta\Psi_m$ , indicando que ocorreu uma despolarização mitocondrial. Além disso, os dois compostos foram capazes de induzir a apoptose em células BEL-7402 indicado pelas diferenças morfológicas apresentadas por essas células.

Ortovanadato de sódio (SOV) promoveu redução na proliferação, evidenciada pela parada no ciclo celular (fase G2/M), morte celular por apoptose e redução do  $\Delta\Psi_m$  em células HepG2 (WU *et al.*, 2014). Neste mesmo trabalho, as avaliações *in vivo* em modelos xenográficos foi observado que o composto SOV reduziu o tamanho do tumor, o índice de proliferação e densidade de microvasos. Este composto também eficaz em inibir a autofagia, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que indica um evento pró-morte.

Entre os potenciais ligantes para o vanádio estão os carboidratos, tanto em unidades monoméricas como na forma de polímeros (BARAN, 2009). De fato, a maioria dos açúcares pode reduzir o vanádio (V) em vanádio (IV) e/ou cátion de oxovanádio  $VO^{2+}$ . Como o oxovanádio  $VO^{2+}$  possui uma forte tendência hidrolítica (GYURCSIK; NAGY, 2000), este, normalmente necessita da presença de grupos doadores de elétrons que nas moléculas de carboidratos são as hidroxilas na forma desprotonadas. Uma vez ligado ao ligante orgânico, pode facilmente desprotonar os grupos hidroxilas (OH) e posteriormente podendo vir a coordenar até quatro ligações (BARAN, 2000; NAGY; SZORCSIK, 2002; BARAN, 2009). A complexação de vanádio com carboidratos vai depender muito do pH da solução, da relação ligante:metal (L:M), da concentração dos reagentes e da temperatura (GYURCSIK; NAGY, 2000). O processo de desprotonação dos grupos OH vai depender do pH da solução, como por exemplo, grupos carboxilados de galactopiranoses iniciaram o processo de complexação ao



redor do pH 3, considerando um ou mais grupos OH desprotonados. Para glucopiranoses, por exemplo, o processo de desprotonação ocorre entre os pH 5 e 9 (GYURCSIK; NAGY, 2000).

Devido à habilidade do vanádio em formar complexos coordenados com os carboidratos, à atividade biológica desses complexos vem sendo investigada (KREMER *et al.*, 2015). Os estudos com polissacarídeos como veículo para liberação de fármacos têm crescido nos últimos anos. Kremer e colaboradores (2015) verificaram que o complexo de alginato – V(IV) apresentou uma seletiva liberação dos complexos de vanádio em pH 8, e não em pH 2, o que o torna um importante carreador do metal para preparações de formulações orais que são estáveis no estômago, porém são liberados como um ingrediente ativo no intestino.

Complexos de vanádio com polissacarídeos como xiloglucanas (FARIAS, 2012; AMARAL *et al.*, 2015; FERNANDES, 2016), galactomananas (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015) e arabinogalactanas (AMARAL *et al.*, 2015) já apresentaram efeitos quanto à atividade leishmanicida, antitumoral e imunomoduladora. Quanto a atividade leishmanicida, os complexos de polissacarídeos com oxovanádio (ARAGAL:VO, GMPOLY:VO e XGJ:VO) demonstraram capacidade em reduzir o crescimento na forma amastigosta de *Leishmania (L.) amazonensis* em ~ 60 % numa concentração doze vezes menor que o composto Glucantime, utilizado para o tratamento da leishmaniose (AMARAL *et al.*, 2015).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAIS E REAGENTES

DMEM alta glucose e soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) foram adquiridos pela Cultilab (Campinas - Brasil);

Cristal violeta, Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), *N* – acetilcisteína (NAC), lactato desidrogenase (LDH), valinomicina, rotenona, ATP, carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona (FCCP), antimicina A, nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) e a sonda DCFDA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil);

A sonda 5, 5', 6, 6' – tetracoloro – 1, 1, 3, 3' – tetraetil – benzimidazoilcarbocianina (JC-1) foi adquirida da Molecular probe;

DMEM Glutamax® alta glucose suplementado com piruvato (Gibco®), solução de Tripsina EDTA (Gibco®), soro fetal bovino (Gibco®), estreptomicina e penicilina (Gibco®) foram adquiridos pela Thermo-Fisher Scientific (França);

Anticorpos primários monoclonais anti-glucose – 6 – fosfato isomerase, anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti – Mcl-1, anti-Glut-1 e anti-tubulina foram adquiridos pela abcam (França);

Anticorpos primários policlonais anti-HIF-1 $\alpha$  (RICHARD *et al.*, 1999) e ARD-1 foram produzidos no laboratório de Tumor Hipóxia e Metabolismo (Nice –França) (BILTON *et al.*, 2005);

Anticorpos secundários: anti-rato e anti-coelho foram adquiridos pela Promega (França).

### 5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA PARCIALMENTE HIDROLISADA

As sementes de *S. amazonicum* foram fornecidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa na Agropecuária) – CPATU – Belém, Pará. Um exemplar está depositado, sob o número 158478, no Herbário (IAN). A extração da galactomanana bem como a confirmação da estrutura do biopolímero foi previamente realizada por Cunha (2013) sendo nomeada SAGM. Esta mesma fração foi parcialmente hidrolisada como descrito a seguir.

Para a hidrólise ácida parcial cinco gramas de SAGM foram solubilizados em 200 mL de água destilada e após completa dissolução foi adicionado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na concentração final de 25 mM e a solução permaneceu a 100 °C por um período de 1 h. A solução foi neutralizada com  $\text{BaCO}_3$ , centrifugada (8000 rpm/ 20 min a 4 °C) para a remoção do sal insolúvel, filtrada, concentrada em rotaevaporador e precipitada com dois volumes de etanol absoluto. Logo em seguida foi realizada a centrifugação (8000 rpm/ 20 min à 4 °C), o precipitado obtido foi lavado por três vezes com etanol absoluto e a fração resultante MSAGM foi seca em estufa à vácuo (25 °C).

5.2.1 Determinação da homogeneidade e massa molar por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detecção por espalhamento de laser multiângulos e índice de refração (HPSEC – MALLS-RI).

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 0,1M contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) 0,2 g/L em uma concentração de 1 mg/mL e foram filtradas através da membrana de acetato de celulose com tamanho de poro 0,22  $\mu\text{m}$ . Em seguida, foi aplicada em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) equipado com detector de índice de refração (RI), modelo WATERS 2410, detector de ultravioleta (UV) Pharmacia LKB modelo VW 2251 e com detector de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$ . O eluente utilizado foi o mesmo da solubilização da amostra, com fluxo de 0,6 mL/min monitorado por bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração ( $dn/dc$ ) das amostras homogêneas foi determinada, sendo que para cada amostra foram utilizadas cinco diferentes concentrações (0,2 - 1 mg/mL) diluídas em  $\text{NaNO}_2$  0,1 M com  $\text{NaN}_3$  0,2 g/L. A massa molar ponderal média foi calculada pelo programa ASTRA utilizando os valores de  $dn/dc$  previamente obtidos.

5.2.2 Determinação da composição monossacarídica

Para determinação da composição monossacarídica os biopolímeros foram hidrolisados com ácido trifluoracético 2M, durante 5 h a 100 °C. Ao término da hidrólise o ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965).

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio, em meio aquoso, a 25 °C por 16 h (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). As soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica Lewatit S-100 para remoção do cátion sódio e para decompor o excesso de agente redutor. Em seguida, o material foi filtrado, evaporado até secura e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1v/v) durante 16 h a 25 °C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

O processo foi interrompido com adição de gelo moído e o material acetilado extraído com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% (m/v) e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi transferida para um tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa.

Para as análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi utilizado um cromatógrafo THERMO Trace GC, coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID). A temperatura da coluna foi de 100 °C durante a injeção, e então programada para 60 °C/min até atingir 230 °C (temperatura constante) e a temperatura do injetor foi de 250 °C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 mL/min. A quantificação dos picos foi obtida por integrador HP acoplado ao cromatógrafo.

### 5.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

#### 5.3.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)

As galactomananas (15 mg) foram solubilizadas em óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) e água (1:1) e as análises foram efetuadas em equipamento BRUKER, modelo ADVANCE DRX-400 acoplado a transformador Fourier. A temperatura utilizada foi de 70 °C, usando acetona como padrão interno. Os resultados foram expressos em ppm.

#### 5.3.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de vanádio 51 (RMN <sup>51</sup>V)

Os espectros de RMN <sup>51</sup>V foram registrados após as amostras serem preparadas por dissolução de 30 mg de complexos de polissacarídeo em 0,8 mL de solução de 0,1 ou 1,0 M KOH para atingir o pH 7,8. Para a análise de RMN <sup>51</sup>V foi utilizada o espectrômetro Bruker DXR 400 utilizando uma sonda inversa de 5 mm. Os espectros de RMN <sup>51</sup>V foram obtidos a

105,15 MHz com 0,5 s e 0,1 s D1 Aq, a 30 °C. Os desvios químicos foram expressos em  $\delta$  (ppm) em relação ao padrão externo  $\text{VOCl}_3$  ( $\delta = 0$ ).

### 5.3.3 Análise por espectrometria de infravermelho (FT-IR- *Fourier Transform – Infrared*)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro BOMEM, Hartmann & Baum, Canadá (Departamento de Química – UFPR). Para realização desse experimento, o brometo de potássio (KBr) foi previamente desidratado em estufa à 120 °C e as galactomananas foram secas com pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) sob vácuo. As pastilhas para obtenção dos espectros foram adquiridas após a homogeneização de KBr (100 mg) e galactomananas (2 mg). Os espectros foram coletados no modo de transmitância na frequência de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans. As análises foram realizadas em temperatura de ~25 °C.

## 5.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DAS GALACTOMANANAS COM OXOVANÁDIO (IV/V)

### 5.4.1 Titulação potenciométrica

O procedimento de titulação potenciométrica foi realizado no Laboratório de Equilíbrio Químico no Departamento de Química da UFPR, pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Ramalho Mercê.

A solução aquosa de  $\text{VO}^{2+/3+}$  foi preparada em 0,1 M de  $\text{HNO}_3$  de acordo com Noleto (2002; 2009) e Amaral (2015). A concentração final do metal ( $\text{VO}^{2+/3+}$ ) neste estudo nomeado VO foi determinada pela *flame* AAS (SpectrAA 220FS – *Atomic Absorption Spectrometer - VARIAN* em *LACAUT* - UFPR). A proporção ligante-metal (2:1) foi estabelecida de acordo com estrutura proposta para ambas as galactomananas (SAGM:VO e MSAGM:VO) com razão Man:Gal 3,2:1. O  $M_w = 162$  g/mol de anidroxose foi utilizado para calcular a massa correspondente a 0,2 mmol dos polissacarídeos que posteriormente foram adicionadas em câmara de titulação com volume final de 50 mL na ausência e na presença de soluções aquosas de VO 0,1 mol/L. Ambas galactomananas (ligantes) foram solubilizadas por no mínimo 12 horas antes de iniciar a titulação.

A titulação potenciométrica foi realizada em um titulador automático modelo 806 (Metrohm Titrand - Suíça) com um *software* Tiamo<sup>®</sup> contendo  $\text{H}^+$  e eletrodos de Ag/AgCl

calibrados com 3 soluções tampões frescas (4,01; 7,0 e 10,01 - Orion, EUA) antes da realização de cada experimento. A força iônica foi mantida pela adição de  $\text{KNO}_3$  0,1 M em um volume final no recipiente de reação de 50,0 mL e temperatura constante ( $25,0 \pm 0,1$  °C) em banho de água circulante (99-22 MQBTC, Microquímica, Brasil). As constantes de estabilidade foram calculadas usando *Hyperquad* (GANS *et al.*, 1996) e o diagrama de espécies obtidas pelo programa HYSS (ALDERIGHI *et al.*, 1999). A constante de protonação dos biopolímeros foram obtidos de acordo com estudos prévios (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2015). As constantes de hidrólise para o  $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  foram determinadas utilizando dados da literatura (MESMER; BAES, 1976) e o valor de  $\text{pK}_w = 13,78$  foi utilizado nos respectivos cálculos.

A obtenção dos complexos para caracterização foi realizada de acordo com as informações prévias do procedimento da titulação potenciométrica, com o valor de pH no qual foram detectadas quantidades significativas de espécies complexadas. Ambas as galactomananas (0,3 g) foram dissolvidas em água ultra – pura e misturadas com 0,1M de  $\text{VO}^{2+}/\text{VO}^{3+}$  a solução foi titulada por adição de 0,1 M e 0,01 M de KOH até atingir o pH 7,8, dialisada em água destilada (por dois dias com três trocas de água) e liofilizada. O procedimento de diálise foi realizado para obter os complexos sólidos livres de íons metálicos. O material resultante foi analisado por RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $^{51}\text{V}$  e FTIR. Os biopolímeros SAGM e MSAGM complexados com oxovanádio (IV/V) foram nominados como SAGM:VO e MSAGM:VO, respectivamente.

## 5.5 CULTIVO CELULAR

### 5.5.1 Modelos celulares

As células de hepatocarcinoma humano (HepG2) foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células HepG2 crescem em monocamada, possuem uma morfologia de característica epitelial, apresentando um ciclo celular com tempo médio de aproximadamente de 20 h (NATARAJAN; DARROUDI, 1991).

As células de adenocarcinoma de cólon humano (LS174T) foram gentilmente cedidas pelo Doutor Van de Wetering, da Universidade de Oxford do Reino Unido. As células LS174T foram isoladas de uma paciente com câncer de cólon do reto em meados de 1970 e assim como as células HepG2 tendem a crescer em monocamadas (TOM *et al.*, 1976).

### 5.5.2 Meios de cultura para as células HepG2 e LS174T

As células HepG2 foram cultivadas em DMEM com alta concentração de glucose, disponível em forma de pó reconstituível. Após dissolução em água ultrapurificada, o meio foi esterilizado por filtração (membrana Millipore® 0,22 µm) e armazenado a 4 °C. Para a adesão, crescimento e multiplicação das células o meio foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (v/v), penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, HEPES 20 mM, bicarbonato de sódio 40 mM e o pH foi ajustado em 7,4.

O meio de cultura DMEM Glutamax® com alta concentração de glucose 25 mM, glutamina 4 mM e piruvato 1 mM; disponível na forma líquida foi utilizado para o cultivo das células LS174T.

Para a realização dos experimentos em condições de normóxia as células foram incubadas em estufa com atmosfera constituída de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C. Já em condições de hipóxia as células foram mantidas em atmosfera de 1% de O<sub>2</sub> em um equipamento apropriado (*Bug Box – Ruskinn*) onde o ar foi substituído por N<sub>2</sub>. O CO<sub>2</sub> foi mantido a 5% em uma temperatura de 37 °C.

### 5.5.3 Solução de tripsina-EDTA

A solução dispersante de células tripsina-EDTA, era constituída de: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, glucose 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mM, EDTA 0,53 mM, 0,05 % (m/v) tripsina (1:250) e 0,002 % (m/v) de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A esterilização da solução foi feita por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm sob pressão em aparelho Sartorius. A solução foi armazenada em frascos estéreis e mantida a -20°C.

### 5.5.4 Solução salina fosfato tamponada (PBS)

A solução foi preparada na forma de estoque 10 vezes concentrada, dissolvendo os seguintes componentes em água ultrapura: NaCl 680 mM, KCl 13,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5 mM. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 L em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120 °C, 1 atm, por 40 min para posterior armazenagem em frasco estéril, mantendo a solução sob temperatura ambiente. Para realização dos experimentos o PBS foi diluído para uma vez.

### 5.5.5 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi constituída da mistura de duas soluções (A e B), as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 10x). A solução A foi composta de NaCl, 2,73 M, KCl, 107 mM, CaCl<sub>2</sub> 25 mM MgSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 27 M. A solução B foi composta por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,5 mM e glucose 111 mM. Essas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e então filtradas em membrana 0,22 µm, para posterior armazenagem em frasco estéril, mantendo a solução sob temperatura ambiente. Na utilização do HBSS, as soluções A e B foram misturadas (1:1) e posteriormente diluídas com água ultrapura.

### 5.5.6 Preparação das soluções das galactomananas para uso nos ensaios de atividade biológica

As preparações de SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO foram solubilizadas em água ultra pura de forma a obter uma concentração final de 5 mg/mL. Para realização dos experimentos em cultivo celular, essas soluções foram previamente filtradas em membrana Millipore® de 0,22 µm em câmara de fluxo laminar e então foram mantidas a -20 °C. Posteriormente as preparações dos biopolímeros foram diluídas em meio de cultura para avaliação dos seus efeitos nas células.

## 5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NAS CÉLULAS HEPG2

### 5.6.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi monitorada pelo método do MTT. Esta metodologia é baseada no princípio de que células viáveis são capazes de reduzir os sais de tetrazólio dando origem a cristais de formazana que são solúveis em DMSO (MOSMANN, 1983).

As células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^4$  em placas de 96 poços, incubadas em estufa em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em temperatura de 37 °C. Após o tempo de 24 h as células foram incubadas com os biopolímeros SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO nas concentrações de 50, 100 e 250 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 h.



Após os tempos de incubação, o meio foi retirado e substituído por solução de MTT em HBSS para uma concentração final de 0,5 mg/mL por poço (200 µL/poço). As culturas foram então incubadas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3 h o sobrenadante foi retirado e o DMSO (200 µL/poço) adicionado para dissolução dos cristais de formazana. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (EPOCH<sup>TM</sup>) em um comprimento de onda de 550 nm, utilizando DMSO como branco. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, considerando 100% para o controle.

#### 5.6.2 Determinação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo método do cristal violeta, corante que permeia a membrana celular em células fixadas com metanol, corando o DNA nuclear (KUENG *et al.*, 1989).

O plaqueamento assim como a incubação com os biopolímeros foram realizados conforme o item 5.6.1. Após a incubação com SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO, os sobrenadantes foram retirados, lavados uma vez com PBS e adicionado metanol absoluto (100 µL/poço) por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida a preparação foi incubada por 3 minutos com solução de cristal violeta (0,2% diluída em etanol 2%) e posteriormente lavadas dez vezes com PBS. A de solução de citrato de sódio 0,05 M em etanol 50% foi utilizada para a eluição do corante. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (EPOCH<sup>TM</sup>) em 550 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, considerando 100% para o controle.

#### 5.6.3 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para o monitoramento das ROS foi utilizado a sonda DCFH<sub>2</sub>-DA (diclorofluoresceínadiacetato). Esta sonda tem a capacidade de permear as células, sendo desacetilada intracelularmente (DCFH<sub>2</sub>) pela ação de esterases. Por conseguinte DCFH<sub>2</sub> é oxidada pelas ROS, originando o produto fluorescente diclorofluoresceína (DCF). Neste trabalho utilizou-se o equipamento *TECAN- Infinite 200 PRO multimode reader*. Os comprimentos de onda utilizados para excitação foi 480 nm e 520 nm de emissão (LEBEL *et al.*, 1992; KALYANARAMAN *et al.*, 2012).

As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$ ) em placas ópticas e após o tempo de 24 h foram incubadas com os biopolímeros SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de 72 h.

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  (400  $\mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo após 2 h de incubação em células HepG2 não tratadas com os biopolímeros. Para normalização dos níveis de ROS foi realizado a medida da viabilidade das células pelo método do MTT e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem, considerando 100% para o controle negativo (células incubadas sem nenhum tratamento).

#### 5.6.4 Determinação da viabilidade celular na presença de *N* - acetilcisteína (NAC)

A viabilidade na presença de NAC foi avaliada pelo método do MTT. As células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/ poço em placas de 96. Após o período de aderência de 24 horas foi realizado o pré – tratamento com NAC 10 mM diluído em meio de cultura DMEM e ajustado para pH 7,4. Passado esse período foi realizado o tratamento com as galactomananas MSAGM:VO nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de 72 h. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, considerando 100% para o controle.

#### 5.6.5 Determinação dos níveis de ATP

A concentração intracelular de ATP foi monitorada com o kit *ATP Bioluminescent assay* da Sigma-Aldrich (FLAA), seguindo as especificações do fabricante. Este ensaio é baseado na oxidação da D-luciferina, reação catalisada pela enzima luciferase, com o consumo de ATP e concomitante emissão de luz. A emissão da luminescência foi monitorada pelo equipamento *TECAN- Infinite 200 PRO multimode reader* e a concentração de ATP ( $\mu\text{mol} \times \text{mg/proteína}$ ) foi calculada utilizando uma curva padrão de ATP (de 0 a 1,25  $\mu\text{mol/L}$ ).

Para estes ensaios as células foram plaqueadas em densidade de  $5 \times 10^5$  células em placas de 60 mm. Após 24 horas foram incubadas com as galactomananas SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  em um tempo de tratamento de 72 h. Após o tempo de tratamento as células foram processadas para a realização do experimento de acordo com as instruções do *kit*.

#### 5.6.6 Avaliação da respiração em células HepG2 intactas

A respiração das células HepG2 intactas foi monitorada em oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a 37 °C sob agitação constante. As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  células em placas de 60 mm e mantidas em incubadora a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h para adesão celular. A seguir foram adicionadas as concentrações dos biopolímeros SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO (100 e 250µg/mL) e incubados por 72 h. Após o tratamentos o meio de cultura foi coletado e reservado para a quantificação de lactato e piruvato. As células aderidas foram destacadas com solução de tripsina-EDTA (1mL), ressuspensas em meio de cultura (2,1 mL) e transferidas para as câmaras do oxígrafo. A respiração celular durante os estados Basal, Leak e desacoplado (GNAIGER, 2001) foi determinada como descrito a seguir.

O monitoramento da respiração iniciou-se imediatamente após a transferência da suspensão celular às câmaras do oxígrafo, sendo este estado denominado de basal. Após cerca de 10 min, adicionou-se oligomicina (2 µg/mL), um inibidor da ATP sintase, sendo este estado da respiração denominado de estado *Leak*, no qual o consumo de oxigênio é decorrente da reentrada de prótons na matriz mitocondrial. O consumo de oxigênio durante o estado *Leak* não se relaciona, portanto, a síntese de ATP. Em seguida, foi adicionado o desacoplador FCCP (0,5 µM), que promove um aumento significativo do consumo de oxigênio, por aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons, sendo este estado denominado de estado desacoplado da respiração. Por fim, para cessar a respiração mitocondrial, foram adicionados os inibidores da cadeia de transporte de elétrons, rotenona (0,5 mM) e antimicina A (3 µg/mL).

A respiração celular foi expressa como fluxo de oxigênio em pmol/(seg × 10<sup>5</sup> células) e os dados representados em porcentagem, sendo o controle considerado como 100 %.

#### 5.6.7 Avaliação da respiração em células HepG2 permeabilizadas

O monitoramento da respiração celular foi realizado como descrito no item anterior. Após a tripsinização a suspensão celular foi centrifugada (2000 rpm/1 min) e ressuspensas em meio contendo: manitol 125 mM; KCl 65 mM; HEPES 10mM, BSA 0,1%; EDTA 1mM solubilizado em água ultra pura e pH 7,2. Na sequência, adicionou-se à suspensão celular

digitonina (20 µg/mL solubilizada em PBS) seguindo-se incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 10 min para a permeabilização da membrana celular.

O consumo de oxigênio das células permeabilizadas foi realizado segundo Kuznetsov *et al* (2008) com algumas modificações. O monitoramento da respiração das células permeabilizadas iniciou-se com a adição da suspensão de células às câmaras do oxígrafo, sendo este período denominado estado basal da respiração. Após alguns minutos foram adicionados malato (5mM) e glutamato (10mM), substratos que uma vez oxidados fornecem elétrons (NADH) para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons. Em seguida adicionou-se, ADP (2mM), rotenona (0,5µM) inibidor do complexo I, succinato (10mM), substrato para o complexo II e por fim a antimicina A (5µM) que inibe o complexo III. A respiração celular foi expressa como fluxo de oxigênio em pmol/(seg×10<sup>5</sup> células). A avaliação da respiração das células permeabilizadas foi realizada com as galactomananas SAGM e MSAGM:VO, na concentração de 250 µg/mL e 72 h de tratamento

#### 5.6.8 Determinação dos níveis de lactato e piruvato

Os sobrenadantes das células tratadas para os ensaios de respiração (item 5.6.5) foram utilizados para a determinação da concentração de lactato e piruvato segundo a metodologia descrita por Gutman & Wahlefeld (1974) e Czoc & Lampecht (1974), respectivamente. A quantificação de lactato e piruvato foi realizada em volume final de 300 µL, em meio de reação contendo tampão glicina 0,1M - hidrazina 0,4 M pH 9,5, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM, lactato desidrogenase 1,5 U e 150 µL de amostra. O sistema foi mantido em estufa a 37°C por 90 min e a quantidade de NADH formada foi determinada em 340 nm em leitor de microplacas (EPOCH). Para a determinação de piruvato em um volume final de 300 µL foi adicionada a mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4, NADH 0,15 mM, lactato desidrogenase 0,05 U e 150 µL de amostra. A quantidade de NADH oxidada foi avaliada espectrofotometricamente em 340 nm após 20 min de incubação a 37°C. A concentração de piruvato e lactato em nmol/L foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar do NADH  $\epsilon = 6.220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

### 5.6.9 Medida do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ )

Para a avaliação do  $\Delta\Psi_m$  foi utilizada a sonda JC-1 cuja entrada na mitocôndria é facilitada pelo potencial de membrana. No interior da organela a sonda, que no citoplasma emite fluorescência verde, passa a emitir fluorescência de cor vermelha. Esse efeito pode ser explicado devido a formação de agregados da sonda que emitem fluorescência de cor vermelha quando concentrados em mitocôndrias com alto potencial de membrana. (PERELMAN *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Para este ensaio, as células foram plaqueadas ( $5 \times 10^5$ ) em placas de 60 mm e após o tempo de 24 h as células foram incubadas com os biopolímeros SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$  no tempo de 72 h.

Após o período de tratamento, as células foram descoladas das placas com solução de tripsina-EDTA e centrifugadas (1 min/1000 rpm em temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em PBS, incubadas com a sonda JC-1 (5  $\mu\text{M}$ ) e então analisadas em citômetro de fluxo (BD Accuri<sup>TM</sup> C6). O ionóforo de potássio valinomicina (1mM) foi utilizado como controle positivo, uma vez que é capaz de promover o colapso do  $\Delta\Psi_m$ .

### 5.6.10 Determinação da viabilidade celular em condições de normóxia e hipóxia

Para essa avaliação as células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^4$  em placas de 60 mm de diâmetro e 24 h após foram incubadas com o biopolímero MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ). As células foram mantidas em condições de hipóxia e normóxia. Após o tratamento (72 h) as células foram então descoladas de cada placa e centrifugadas (1000 rpm/ 1min). O sobrenadante foi descartado, as células foram suspensas em PBS e posteriormente incubadas com soluções fornecidas pelo equipamento ADAM-MC.

ADAM-MC baseia-se na coloração de DNA de células eucarióticas com o corante fluorescente iodeto de propídeo (PI). PI é um agente intercalante de DNA que é capaz de entrar em células com membranas celulares danificadas ou com metabolismo inativo, deixando seus núcleos corados. ADAM-MC fornece dois tipos de soluções de coloração: 1) Solução *AccuStain* T para a contagem total de células que é composta de PI e solução de lise; e 2) Solução *AccuStain* N para a contagem de células não-viáveis o qual é composto de PI e PBS. A fim de medir a concentração total de células, as membranas plasmáticas de todas as células devem ser rompidas para marcar todos os núcleos com PI. O processo de ruptura e

coloração é conseguido por tratamento com a solução *AccuStain* T. Na segunda solução, as células viáveis permanecem intactas e não são coradas. Apenas as células não viáveis são coradas e detectadas. Após o tratamento com as duas soluções estas foram pipetadas no chip do equipamento. A medida da viabilidade foi calculada automaticamente no software ADAM-MC após a contagem das células totais e das células não viáveis.

#### 5.6.11 Avaliação da atividade das caspases 3 e 7 em condições de normóxia e hipóxia

A determinação da atividade das caspases foi monitorada com o kit *Caspase-Glo 3/7*, *Promega*, seguindo as especificações do fabricante. Este ensaio é baseado na liberação de um substrato para a luciferase após clivagem das caspases que como consequência emite luz. A emissão da luminescência foi monitorada pelo equipamento GloMax®. A medida da luminescência é proporcional a quantidade da atividade das caspases 3 e 7. Para esta metodologia as células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^3$  em placas de 96 poços e posteriormente as células foram mantidas em condições de hipóxia e normóxia por 72 h. Após o período de tratamento foi realizado o monitoramento das caspases 3/7.

#### 5.6.12 Avaliação da morfologia das células HepG2 em condições de normóxia e hipóxia por coloração DAPI

Esta metodologia foi realizada por microscopia confocal após coloração por DAPI (4, 6 – diamidino – 2 – phenylindole). O DAPI pode fornecer dados para detecção de células em processo de apoptose, baseado na emissão de fluorescência azul. Para esse experimento, as células HepG2 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$ ) em placas de 6 poços e, após o período de adesão as células foram incubadas com MSAGM:VO (250 µg/mL) em condições de normóxia e hipóxia por 72 h seguindo-se da coloração DAPI e análise por microscopia confocal.

#### 5.6.13 Determinação dos níveis de expressão das proteínas BCL-2, BCL-XL, MCL-1, HIF-1α, LC3-1, LC3-II, p62, GPI, GLUT-1, TXNIP, tubulina e ARD-1 por western blot

As células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^4$  em placas de 60 mm de diâmetro e após o tempo de 24 h, foram incubadas com o biopolímero MSAGM:VO (250µg/mL). As células foram mantidas em condições de hipóxia e normóxia por um período

de 72 h. Depois de passado o período de incubação, as células foram lisadas com tampão contendo SDS (tampão Laemmli diluído 1,5x).

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método do BCA (*Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit*) seguindo as instruções do fabricante. 40 µg/mL de proteínas foram separadas em um gel de 10% de SDS-PAGE e então transferidas em uma membrana de PVDF (Millipore). Após a transferência do gel para a membrana a mesma foi bloqueada com 5% de leite desnatado em tampão TN (50 mM de TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl) e então incubada de um dia para o outro com os anticorpos primários: HIF-1 $\alpha$ , Bax, Bcl-xL, Mcl-1, LC3, p62, GPI, GLUT-1, TXNIP e tubulina e ARD-1 (utilizadas para normalização). Bandas imunoreativas foram detectadas pelo sistema ECL (*Amersham Biosciences*) depois da incubação da membrana com anticorpos secundários *anti-mouse* e *anti-rabbit* (Promega).

## 5.7 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS LS174T APÓS SILENCIAMENTO DA ENZIMA GPI

### 5.7.1 Silenciamento da enzima GPI nas células LS174T mediado pelo sistema CRISPR/cas9

As células LS174T foram transfectadas com o plasmídeo (CRISPR/Cas9) contendo a sequência para o silenciamento da enzima Glucose – 6 – Fosfato Isomerase (GPI). O *design* do plasmídeo foi realizado pelo Engenheiro Dr. Jérôme Durivault do laboratório do *Centre Scientifique de Monaco*. Na realização da transfecção foi utilizado o kit *JetPRIME*<sup>®</sup> de acordo com as instruções do fabricante. As células transfectadas foram detectadas pelo *sorting* (FACS) e somente as células GFP positivas foram selecionadas e adicionadas na proporção de 100 células/placa de 100 mm de diâmetro. As células selecionadas foram incubadas com meio DMEM Glutamax em estufa a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para a formação de clones. Cada clone foi coletado e analisado a expressão da proteína GPI pela metodologia de *western blot*.

As células LS174T foram plaqueadas em uma densidade ótima e então mantidas em condições de hipóxia e normóxia por um período de 24 h. Depois de passado o tempo de incubação, as células foram lisadas e as proteínas quantificadas conforme descrito no item 5.6.12.

### 5.7.2 Ensaio clonogênico

Células LS174T foram plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^3$  células por placa de 60 mm e após 24 h o meio foi substituído com e/ou sem fenformina em uma concentração de 50  $\mu$ M por aproximadamente 10 dias em condições de normóxia (21% de  $O_2$ ) e 15 dias em condições de hipóxia (1% de  $O_2$ ). Após incubação as colônias foram fixadas com metanol 10% (v/v) por 15 min e imediatamente coradas com Giemsa (Sigma) por 30 min para posteriormente visualização das mesmas.

### 5.7.3 Análise de parâmetros metabólicos

A taxa de acidificação extracelular (*ECAR*) e a taxa de consumo de oxigênio (*OCR*) foram monitoradas pelo equipamento *Seahorse XF96 extracellular flux analyzer* (Seahorse Bioscience, MA, USA). Para este experimento as células LS174T foram plaqueadas em uma densidade de  $25 \times 10^4$  (conforme testes preliminares) em placas específicas do equipamento. As células foram então deixadas em condições de normóxia e hipóxia por 24 h. Antes da realização dos experimentos, as placas foram incubadas durante 45 min em incubadora livre de  $CO_2$  em uma temperatura de 37 °C com meio DMEM livre de glucose, piruvato, soro fetal bovino e tampão. Os experimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante. Os dados foram apresentados como taxa de acidificação extracelular (*ECAR*: MPH/min/ $\mu$ g de proteína) para a glicólise e taxa de consumo de oxigênio (*OCR*: pMoles  $O_2$ /min/  $\mu$ g de proteína). Após os experimentos foi realizada a quantificação das proteínas pelo método do BCA para posterior normalização dos dados gerados pelo equipamento.

### 5.7.4 Avaliação da proliferação das células LS174T

As células LS174T foram plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^4$  em placas de 6 poços em duplicata em condições de normóxia e hipóxia. A medida da proliferação foi realizada por tripsinização e posteriormente realizada a contagem diariamente em um contador automático de células (ADAM-MC<sup>TM</sup>) conforme já descrito no item 5.6.9 durante cinco dias. O índice de proliferação das células foi calculado dividindo-se o número de células obtido em 24 h (dia 0) por cada dia após o plaqueamento.

### 5.7.5 Determinação dos níveis de ATP intracelular das células LS174T em condições de normóxia e hipóxia



Para verificar o efeito de fenformina em níveis intracelulares de ATP,  $1 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com a fenformina ( $50 \mu\text{M}$ ) ~ 6 h para ambas as condições de normóxia e hipóxia. Os níveis de ATP foram monitorados pelo kit *Cell-Titer-Glo* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi monitorada pelo equipamento GloMax®. Os resultados foram expressos como uma unidade de luminescência relativa (RLU) e a normalização da proteína (pelo método de BCA) foi efetuada após cada experimento.

#### 5.7.6 Viabilidade das células LS174T em condições de normóxia após tratamento com fenformina

As células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^4$ /poço em placas de 6 poços e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h foi adicionado fenformina ( $50 \mu\text{M}$ ) e controle sem fenformina foram incubadas por 5 dias nas mesmas condições. Após o tratamento, o sobrenadante foi recolhido e as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e lavadas novamente, em seguida, as células foram centrifugadas (5 min, 1000 rpm) após esses procedimentos foi realizada a avaliação da viabilidade pelo equipamento ADAM-MC™ conforme previamente descrito no item 5.6.9.

#### 5.7.7 Determinação dos níveis de lactato extracelular em condições de normóxia e hipóxia

As células LS174T ( $1 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em placas de 100 mm e então incubadas por 24 h em condições de normóxia e hipóxia, após esse período foi coletado 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. Os sobrenadantes foram centrifugados (8000g,  $4^\circ\text{C}$ , por 5 minutos) e analisados pelo equipamento *Cobass c701 instrument* (Roche), em colaboração com o laboratório de Bioquímica da Universidade de Nice. Este método é baseado na conversão enzimática de lactato a piruvato pela lactato oxidase, juntamente com a reação colorimétrica de peróxido de hidrogênio formado na primeira reação, resultando em um composto colorido, cuja intensidade é medida espectrofotometricamente e é diretamente proporcional à concentração de lactato. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína e expressos em mM de lactato/ $\mu\text{g}$  de proteína.

### 5.7.8 Avaliação do silenciamento da enzima GPI em modelos xenográficos

As células LS174T foram suspensas ( $1,5 \times 10^6$  células) em 300  $\mu$ L de DMEM isento de soro fetal bovino e suplementado com insulina transferrina-selênio (Life Technologies) e injetadas subcutaneamente no dorso dos camundongos *nude* fêmeas de 8 semanas de idade. Água contendo 5% de sacarose com e sem fenformina (200 mg/ kg/dia) foi dada livremente para os camundongos que foram divididos em 4 grupos com um  $n$  de 10. As dimensões dos tumores foram medidas a cada 2-3 dias utilizando um paquímetro e o volume foi determinado por meio da seguinte fórmula:  $(4\pi / 3) \times L/2 \times W/2 \times H/2$  (L: comprimento, W: largura, e H : altura). Quando o volume do tumor atingiu 1000 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram eutanaziados e os tumores foram recolhidos. Os experimentos realizados com os camundongos *nude* foram aprovados pelo Comitê de Ética e Cuidado Animal da Universidade de Nice – Sophia Antipolis (CIEPAL – *azur agreement NCE/165*).

### 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados expressos como média  $\pm$  DP foram previamente submetidos à análise estatística pelo método ANOVA e teste de *Tukey* para determinar as diferenças significativas entre os grupos. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

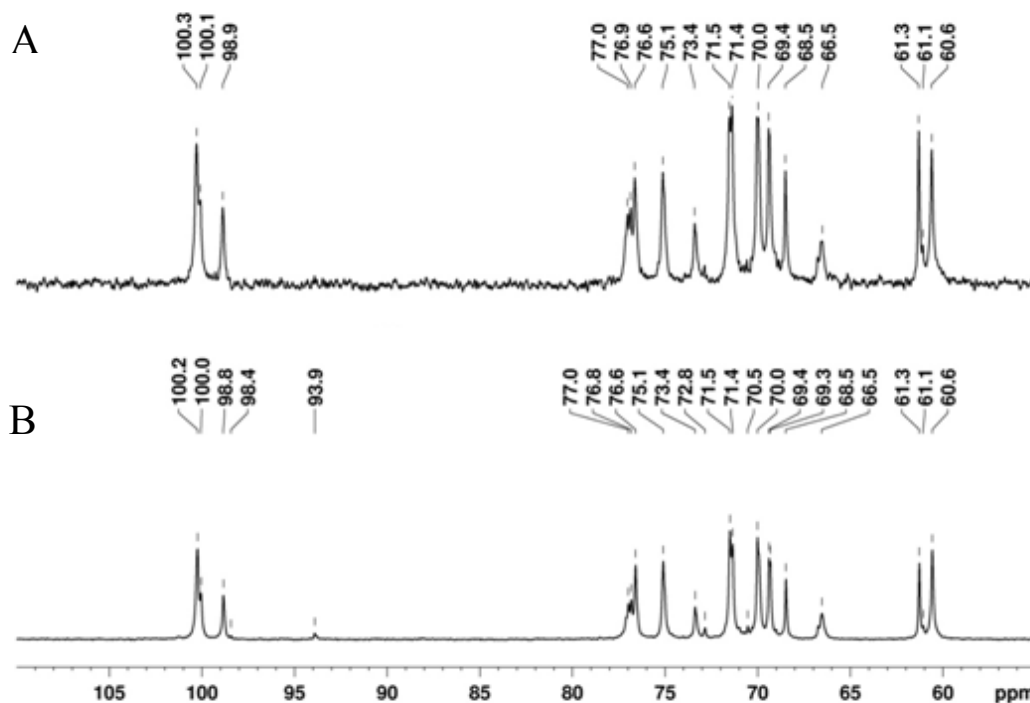
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GALACTOMANANAS E SEUS COMPLEXOS COM OXOVANÁDIO (IV/V)

A galactomanana extraída das sementes de *S. amazonicum* apresentou razão Man:Gal de 3,2:1, o que está de acordo com resultados anteriores descritos para galactomananas da mesma espécie obtidas nas mesmas condições (GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 2001; PETKOWICZ *et al.*, 2007; BENTO *et al.*, 2013). O polímero obtido foi nomeado SAGM (*Schizolobium amazonicum GalactoMannan*) e então submetido à hidrólise ácida parcial. Após a remoção de monossacarídeos e oligossacarídeos, o produto da hidrólise ácida parcial foi nomeado MSAGM (*Modified Schizolobium amazonicum GalactoMannan*). A razão Man:Gal para a galactomanana parcialmente hidrolisada (MSAGM) foi determinada após análise da composição monossacarídica apresentando a mesma razão Man:Gal de SAGM (3,2:1). No estudo de Noletto e colaboradores (2009) a obtenção de galactomananas de sementes de *M. scabrella* sem inibição enzimática resultou em um polímero parcialmente hidrolisado, cuja razão Man:Gal também não foi alterada em relação a forma não hidrolisada.

A estrutura de SAGM foi investigada por espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 15) por Cunha e colaboradores (2017) e confirmou-se ser uma galactomanana de estrutura usual, composta por uma cadeia principal de unidades de D-manopiranoses unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais de unidades de D-galactopiranoses unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6). Os sinais foram atribuídos segundo dados da literatura (GANTER *et al.*, 1995; BUCKERIDGE; DIETRICH, 1996; PETKOWICZ *et al.*, 1998; RAMESH *et al.*, 2001; BENTO *et al.*, 2013).

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DAS GALACTOMANANAS (SAGM E MSAGM) OBTIDAS DAS SEMENTES DE *S. amazonicum*

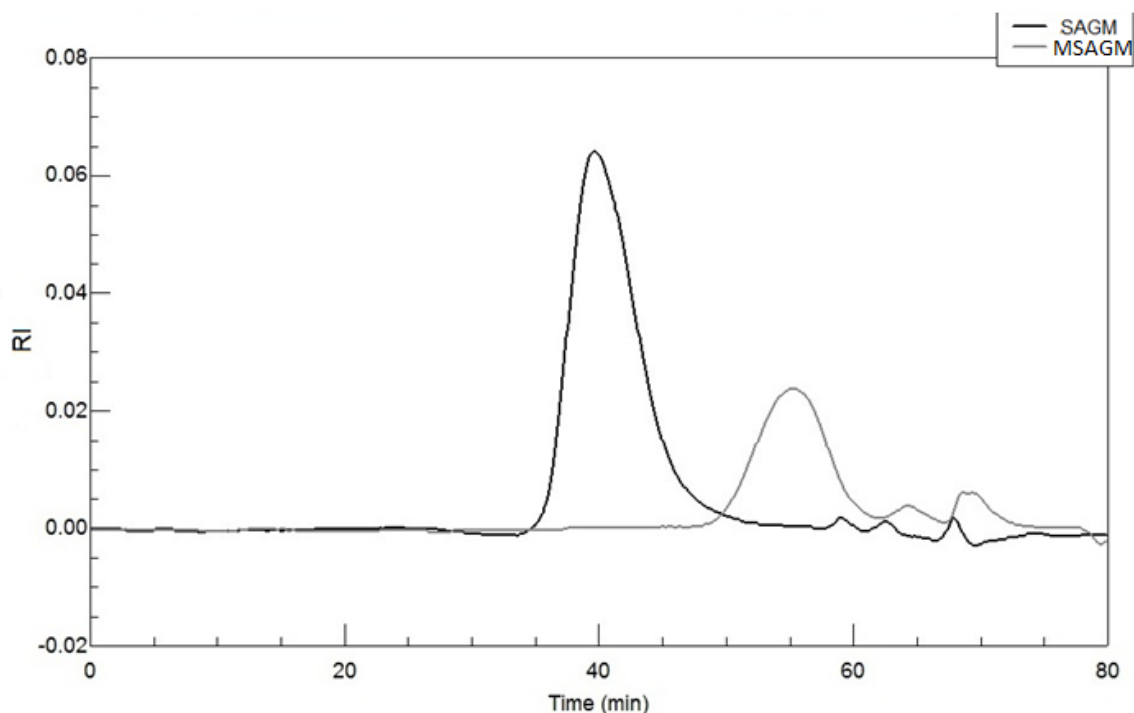


FONTE: A) CUNHA – DE PADUA *et al* (2017) com autorização da Elsevier and Copyright Clearance Center (número da licença: 4131610004073) e; B) o autor (2017).

NOTA: A) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da galactomanana extraída do endosperma de sementes de *S. amazonicum* obtidas por extração aquosa à 25 °C (SAGM) e B) Galactomanana obtida após hidrólise ácida parcial (25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) por 1 hora à 100 °C. As amostras (15 mg) foram previamente solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e analisadas em RMN  $^{13}\text{C}$  a 70 °C em 100 MHz. A acetona foi utilizada como padrão interno 32 ppm.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de MSAGM e SAGM (FIGURA 15) foram extremamente semelhantes. Porém, para MSAGM, na região do carbono anomérico observa-se a presença de um sinal adicional em  $\delta$  93,9 que foi atribuído ao C-1 de extremidades redutoras (AGRAWAL, 1992), sugerindo que o polímero apresenta uma baixa massa molecular. As galactomananas SAGM e MSAGM foram caracterizadas por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) onde os perfis de eluição podem ser observados na figura 16. Ambas as amostras apresentaram um perfil monomodal confirmando um único tipo de polissacarídeo, porém para a galactomanana MSAGM pode ser observado um tempo de eluição maior em comparação a amostra SAGM, devido a uma massa molecular inferior ( $M_w$ ). Para SAGM a  $M_w$  obtida foi  $4,34 \times 10^5$  g/mol (CUNHA - DE PADUA *et al.*, 2017) e para MSAGM a  $M_w$  foi de  $1,56 \times 10^4$  g/mol.

FIGURA 16 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO SOMENTE O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) DAS FRAÇÕES SAGM E MSAGM



FONTE: O autor (2017).

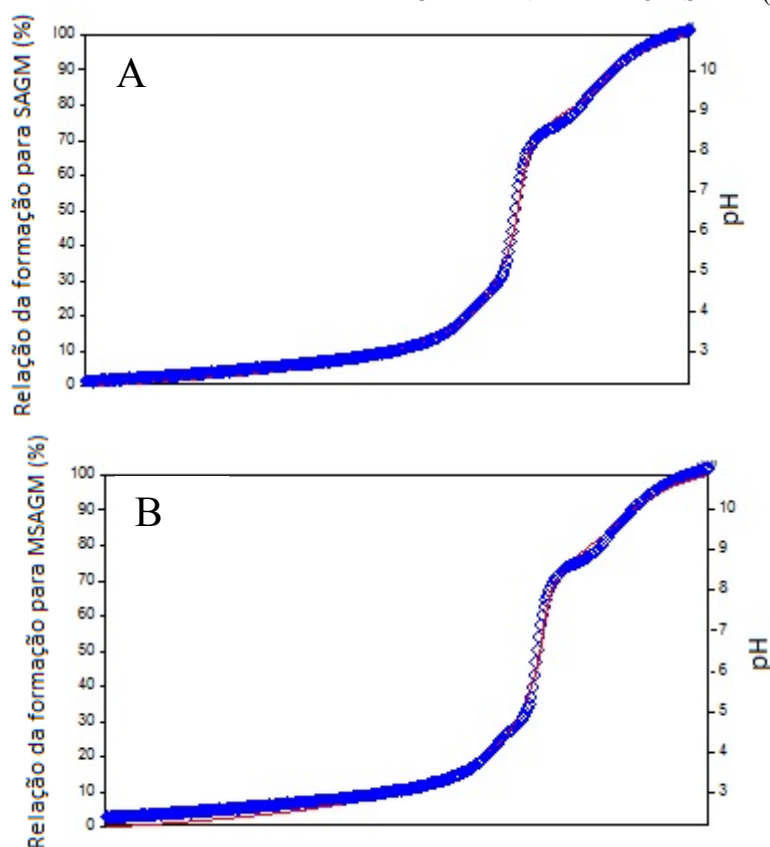
NOTA: As amostras (1 mg/mL) foram solubilizadas em nitrato, filtradas em membrana 0,22µm e então analisadas por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) acoplado ao índice de refração (RI) e espalhamento de luz multiângulos (MALLS).

A estreita relação entre a atividade biológica e a estrutura química dos polissacarídeos motiva a realizar modificações químicas nestes biopolímeros com a finalidade de se obter derivados com efeitos diferenciados e de fácil aplicação nas mais variadas áreas (BARAN, 2000; KREMER *et al.*, 2015). Neste estudo, as galactomananas nativa (SAGM) e parcialmente hidrolisada (MSAGM) foram complexadas com oxovanádio com o objetivo de obter complexos com diferentes conteúdos de vanádio, uma vez que a hidrólise do biopolímero pode resultar em moléculas com variados sítios de ligação para o metal. O uso do vanádio na forma de complexos com ligantes orgânicos favorece uma maior aplicação deste metal, porque possibilita explorar suas propriedades biológicas em especial a farmacológica, tanto *in vivo* (THOMPSON *et al.*, 2004) quanto *in vitro* (THOMPSON; ORVIG, 2006).

Em estudos prévios, galactomananas e outras classes de polissacarídeos foram complexados com oxovanádio (IV/V) utilizando a técnica de titulação potenciométrica (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; ADRIAZOLA *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2015).

Neste estudo, a interação entre as preparações das galactomananas SAGM e MSAGM com o oxovanádio (VO) também foi realizada por titulação potenciométrica. Na figura 17 estão representadas as curvas titulométricas do modelo teórico e obtidas experimentalmente. Os perfis foram similares para ambas às preparações das galactomananas na presença do oxovanádio (FIGURA 17 A, B). Os dados experimentais foram utilizados para os cálculos das constantes de estabilidade considerando o equilíbrio das espécies em quantidade acima de 10% obtidos com uma concentração do metal de 100%. As constantes de complexação encontradas mostram a existência de quatro e cinco espécies em equilíbrio para sistema VO com SAGM e com MSAGM, respectivamente (TABELA 1).

FIGURA 17 - PERFIL DO POTENCIAL TITULOMÉTRICO DAS GALACTOMANANAS NATIVA (SAGM) E PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM)



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Perfil potenciométrico das galactomananas nativa (SAGM) (A) e parcialmente hidrolisada (MSAGM) (B) na presença de VO. (—) Simulado e experimental (◊) na proporção ligante:metal de 2:1. T = 25 °C,  $\mu$  = 0.100 M KNO<sub>3</sub>.

Os valores das constantes de estabilidade para as principais espécies detectadas foram semelhantes para ambas as preparações das galactomananas com VO, exceto para o equilíbrio  $[L_2(OH)_2(VO)_2]/[L]^2 \cdot [OH]^2 \cdot [VO]^2$  que foi detectado apenas no sistema contendo a galactomanana parcialmente hidrolisada (MSAGM). Os equilíbrios  $[LVO]/[L] \cdot [VO]$  e

[LVOH]/[LVO].[H] para SAGM e MSAGM apresentaram maiores valores para as constantes de complexação quando comparados com sistemas contendo outros polissacarídeos incluindo galactomananas de outras fontes com VO, como por exemplo, os valores para as constantes de complexação obtidos para as galactomananas de *Mimosa sacabrella*, na sua forma nativa (GALMAN-A) e hidrolisada (GALMAN-B) na presença de oxovanádio [LVO]/[L].[VO] (L=GALMAN-A,  $\log K=12,22\pm0,04$  e L=GALMAN-B  $\log K=11,65\pm0,05$ ) e [LVOH]/[LVO].[H] (L=GALMAN-A,  $\log K=3,17 \pm 0,09$  e L=GALMAN-B  $\log K = 3,74\pm0,08$ ) (NOLETO *et al.*, 2009).  $\log K = 8,41\pm0,007$  foi encontrado para o equilíbrio [LVO]/[L].[VO] no sistema contendo galactomanana do líquen *Ramalina celastri* e VO (GMPOLY-VO) (NOLETO *et al.*, 2002). Para os sistemas contendo arabinogalactana de *Anadenanthera colubrina* com VO (ARAGAL:VO) e xiloglucana de *Hymenaea courbaril* com VO (XGJ:VO) as constantes de complexação para o equilíbrio [LVO]/[L].[VO] foram  $\log K= 12,16\pm0,020$  e  $\log K= 11,80\pm0,100$ , respectivamente (AMARAL *et al.*, 2015). Estes dados mostram que para estes equilíbrios as preparações de galactomananas utilizadas neste estudo ligam mais fortemente ao VO. É importante ressaltar que outros equilíbrios foram detectados em todos os sistemas citados e que variaram de acordo com as características de cada ligante.

TABELA 1 – CONSTANTES DE COMPLEXAÇÃO CALCULADAS PARA OS COMPLEXOS SAGM:VO E MSAGM:VO

Log K	SAGM:VO	MSAGM:VO
[LVO]/[L].[VO]	14.26±0.03	14.54±0.03
[LVOH]/[LVO].[H]	17.16±0.06	17.83±0.05
[LOHVO]/[LVO].[OH]	7.36±0.06	6.92±0.09
$[L(VO)_2(OH)_2]/[L].[VO]^2.[OH]^2$	11.22±0.03	11.58±0.04
$[L_2(OH)_2(VO)_2]/[L]^2.[OH]^2.[VO]^2$	n.d.	17.91±0.06

FONTE: O autor (2017)

NOTA: L= SAGM ou MSAGM; n.d. = não detectado

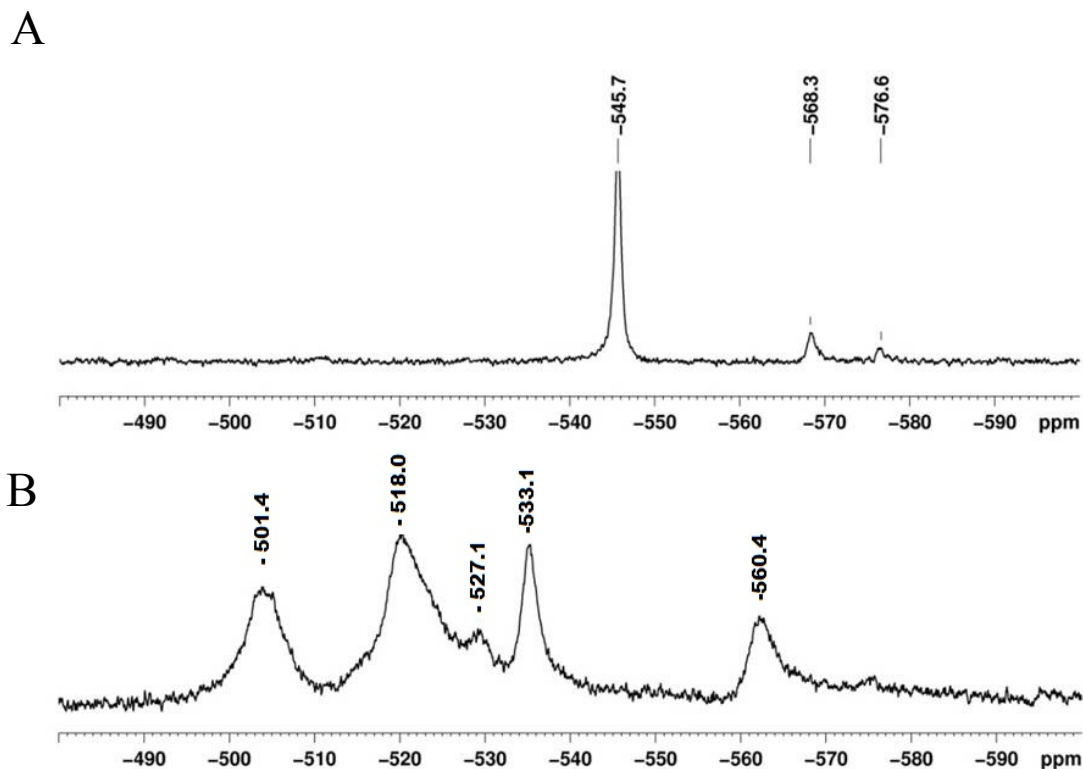
Considerando que na solução de oxovanádio utilizada no presente estudo há uma mistura deste metal nos estados de oxidação +4 e +5, a caracterização dos complexos foi inicialmente confirmada por RMN  $^{51}\text{V}$ , técnica que possibilita detectar íons de vanádio no

estado de oxidação +5. O espectro demonstrativo do complexo SAGM:VO está indicado na figura 18. Pode-se observar três sinais com intensidades significativas nas regiões de  $\delta$  – 547,1; – 569,7 e – 577,9 ppm indicando a presença de três diferentes espécies de complexos formados para SAGM:VO. O espectro do complexo MSAGM:VO apresentado na figura 18 B mostra a presença de cinco sinais identificados em  $\delta$  – 501,4; – 518,0; – 527,1; – 533, 1 e – 560,4 ppm sugerindo cinco diferentes espécies de complexos. Sinais nessas regiões ( $\delta$  – 571 e  $\delta$  – 558 ppm) foram encontrados para os complexos das preparações de galactomanana de *M. scabrella* (GALMAN-A e GALMAN-B) com oxovanádio (IV/V) (NOLETO *et al.*, 2009). Amaral e colaboradores (2013) identificaram sinas nas regiões de  $\delta$  – 571,8 e – 576,0 ppm para os complexos de XGJ:VO, enquanto que para os complexos de ARAGAL:VO foram observados três sinais adicionais em  $\delta$  – 423,1; – 488, 4; – 514,0 ppm nos espectros de RMN  $^{51}\text{V}$ . Adicionalmente, deslocamentos para campos mais baixos ( $\delta$  – 493,1; – 507,9 e – 553,8 ppm) foram encontrados para os complexos de GALMAN-A com vanadato (TISCHER *et al.*, 2004) quando comparado ao estudo de NOLETO *et al.*, (2009), no qual este biopolímero foi complexado com oxovanádio (IV/V).

Embora uma das ferramentas para detecção da presença de vanádio em uma amostra seja a espectroscopia de RMN  $^{51}\text{V}$  esta não pode ser considerada útil para detecção de sinais paramagnéticos de íons de complexos de oxovanádio no estado IV ( $\text{VO}^{2+}$ ). Neste sentido, somente o vanádio no estado de oxidação V é detectado no RMN  $^{51}\text{V}$ , sendo assim, apenas os complexos da galactomanana contendo o vanádio  $\text{VO}^{3+}$  são visualizados no espectro (CORNMAN *et al.*, 1995; TISCHER *et al.*, 2004). Uma forma de detectar se nas preparações complexadas com o vanádio existe o  $\text{VO}^{2+}$  é a técnica do EPR (CANTLEY; AISEN, 1979; WILSON; WEBER, 1979; CORNMAN *et al.*, 1995; SMITH II *et al.*, 2002). Previamente, as preparações de soluções de oxovanádio utilizando o sulfato de vanadilo em ácido nítrico foram analisadas por EPR e confirmadas à presença de vanádio no estado de oxidação (+4) (MERCÊ *et al.*, 1999).



FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN  $^{51}\text{V}$  DAS GALACTOMANANAS NATIVA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO) E NA SUA FORMA PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM:VO)



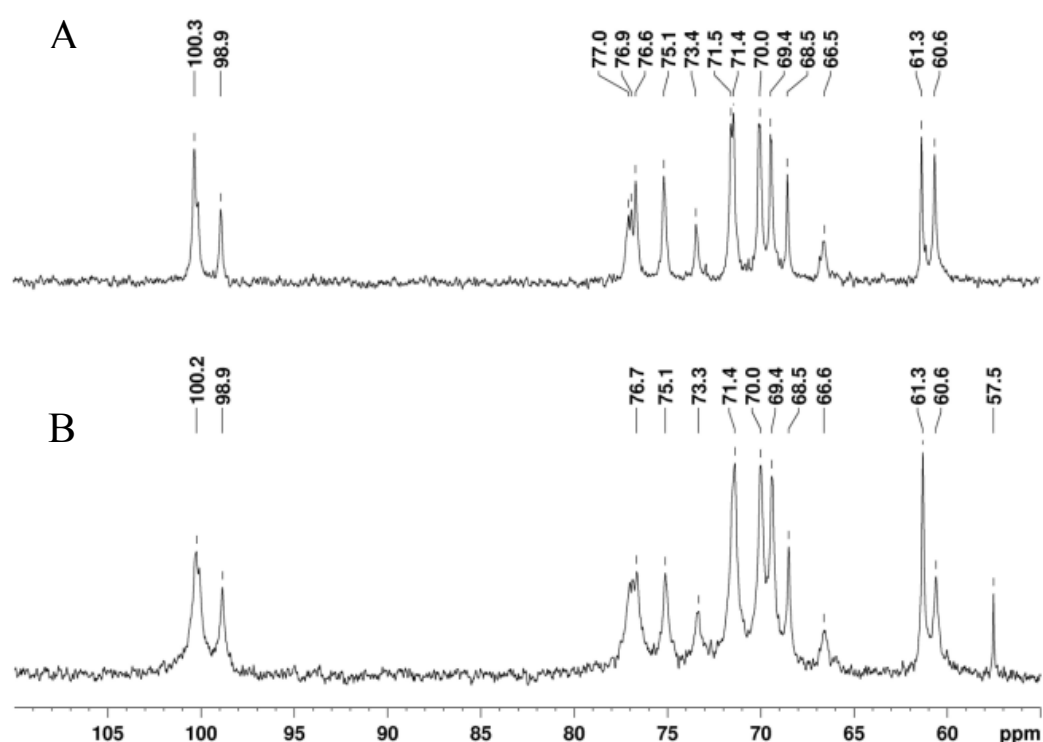
FONTE: O autor (2017)

NOTA: (A) SAGM:VO e (B) MSAGM:VO. As amostras (15 mg) foram previamente solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  e ajustadas para pH 7.8 utilizando KOH (diluído em  $\text{D}_2\text{O}$ ). A análise de RMN  $^{51}\text{V}$  foi realizada em uma temperatura de 30 °C a 100 MHz.

A análise de RMN  $^{13}\text{C}$  também indicou que a complexação ocorreu, uma vez que foram detectadas diferenças nos espectros representados na figura 19. Como pode ser observado, na figura 19 no espectro referente à SAGM:VO (B) comparado com o espectro referente à SAGM (A), os sinais apresentaram-se mais alargados entre as regiões dos C-1 a C-6, indicando a decorrência de alterações nos tempos de relaxamentos das estruturas que contêm metais. A intensidade do sinal relacionado ao C-6 ( $\delta$  60.6 ppm) de unidades de manopiranoses não substituídas se mostrou reduzida no espectro do polímero complexado. Além disso, a presença de um sinal adicional em  $\delta$  57.5 ppm no espectro de SAGM:VO também pode ser considerada uma indicação de complexação. No entanto, não houve diferenças entre os sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  referentes às galactomananas MSAGM e MSAGM:VO (FIGURA 20).

Alargamento de sinais referente à complexação com oxovanádio também foi observado por Noleto (2002). Neste trabalho a autora avaliou por RMN  $^{13}\text{C}$  polissacarídeos obtidos de *Saccharomyces cerevisiae* (mananas) e *Ramalina celastri* (galactomananas). No entanto, o alargamento de sinais após a complexação com oxovanádio, só foi possível observar para as mananas, uma vez que os demais polímeros apresentaram espectros de difícil interpretação.

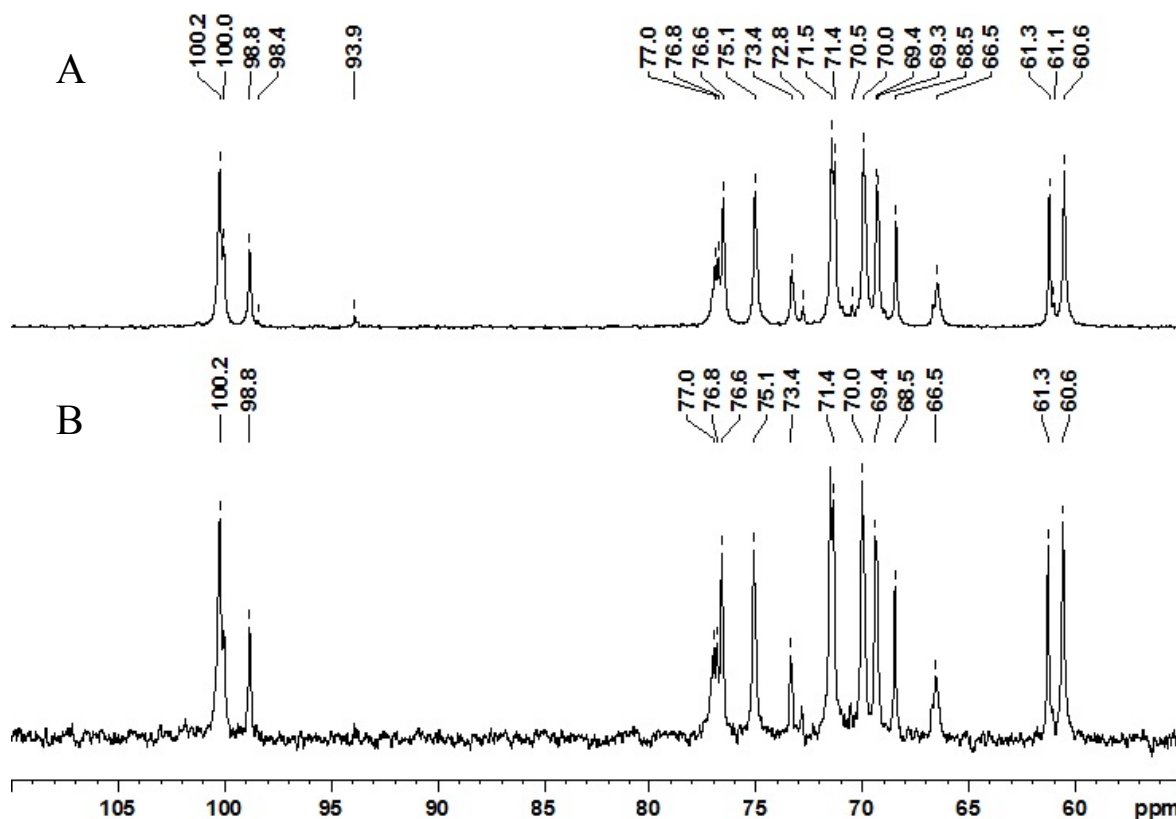
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *S. amazonicum* (SAGM) E NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO)



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da galactomanana extraída do endosperma de sementes de *S. amazonicum* obtidas por extração aquosa a 25 °C (SAGM) e B) SAGM obtida após complexação com VO (SAGM:VO). As amostras (15 mg) foram previamente solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$  e analisadas em RMN  $^{13}\text{C}$  a 70 °C em 100 MHz. A acetona foi utilizada como padrão interno 32 ppm.

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DAS GALACTOMANANAS PARCIALMENTE HIDROLISADA DE *S. amazonicum* (MSAGM) E NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO)



FONTE: O autor (2017).

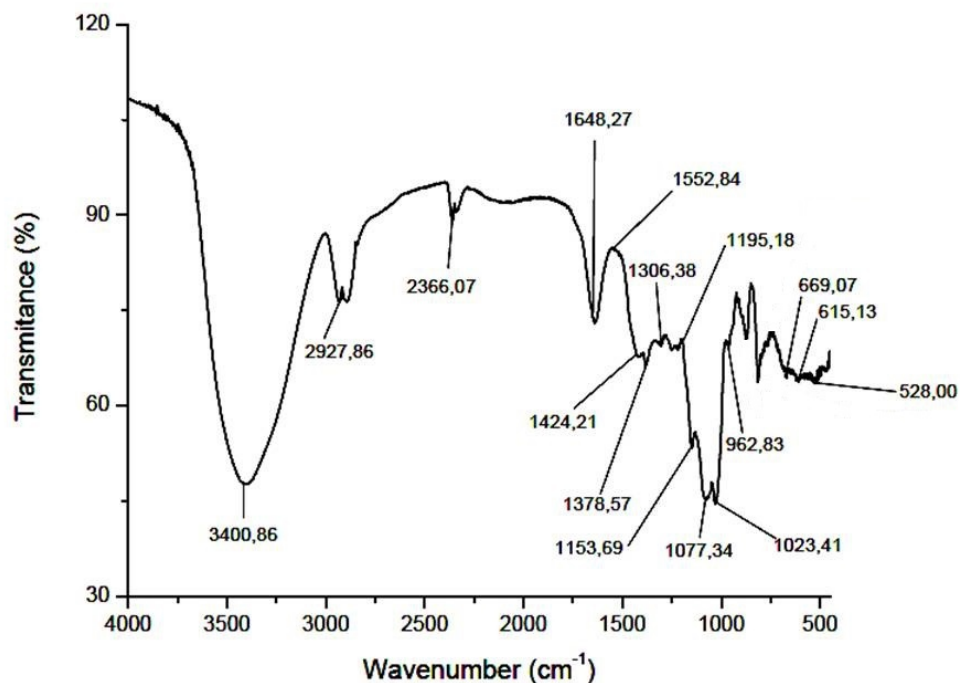
NOTA: A) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da galactomanana obtida após hidrólise ácida parcial (MSAGM) e B) MSAGM obtida após complexação com VO (MSAGM:VO). As amostras (15 mg) foram previamente solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$  e analisadas em RMN  $^{13}\text{C}$  a 70 °C em 100 MHz. A acetona foi utilizada como padrão interno 32 ppm.

As galactomananas complexadas e não complexadas também foram monitoradas por FT-IR, a fim de obter mais informações em relação à complexação. Na figura 21, estão apresentados os espectros relacionados aos polímeros SAGM, MSAGM, SAGM:VO e MSAGM:VO. Em relação aos espectros MSAGM e MSAGM:VO, nota-se diferenças em relação às bandas pertinentes as ligações C – H, C –  $\text{H}_2$  e C – OH. MSAGM (FIGURA 21 C) apresentou um sinal de fraca absorção no comprimento de onda de  $1088\text{ cm}^{-1}$  enquanto que para MSAGM:VO (FIGURA 21 D) foi evidenciado um sinal de forte absorção na região de  $1069\text{ cm}^{-1}$ . Tais diferenças podem ser devido à complexação do metal com átomos de oxigênio (C – OH) evidenciado por deformações nestas ligações, confirmando a complexação de íons de vanádio ( $\text{HO} - \text{C}_6$ ) com a galactomanana (MSAGM:VO). Outras diferenças

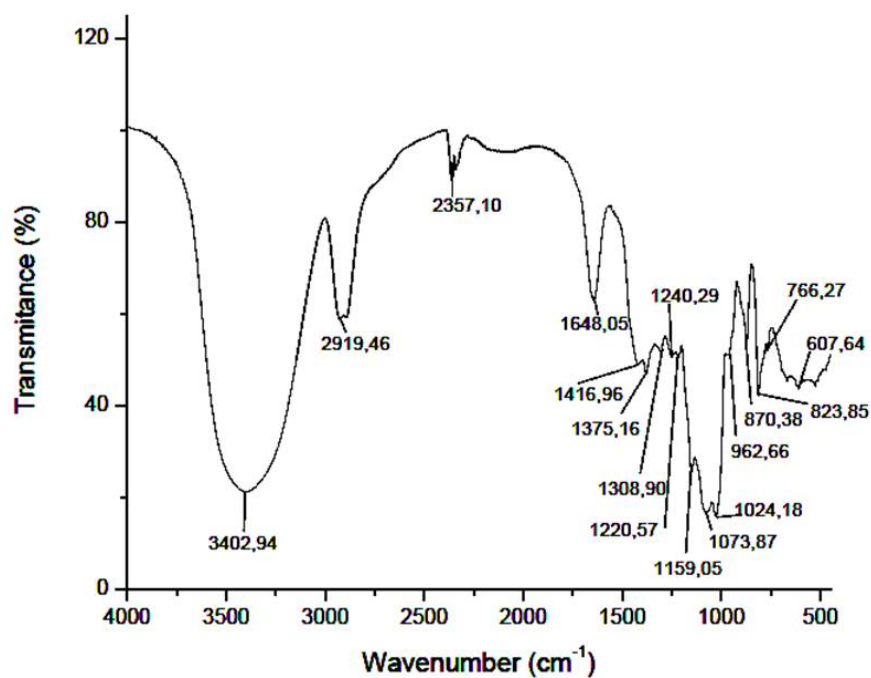
observadas foram entre as bandas  $1437\text{ cm}^{-1}$  para MSAGM e  $1423\text{ cm}^{-1}$  para MSAGM:VO, onde foi observado um forte e fraco sinal, respectivamente.

FIGURA 21 – ESPECTRO DE FTIR DAS GALACTOMANANAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *S. amazonicum* (SAGM), NA SUA FORMA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (SAGM:VO), PARCIALMENTE HIDROLISADA (MSAGM) E PARCIALMENTE HIDROLISADA COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO)

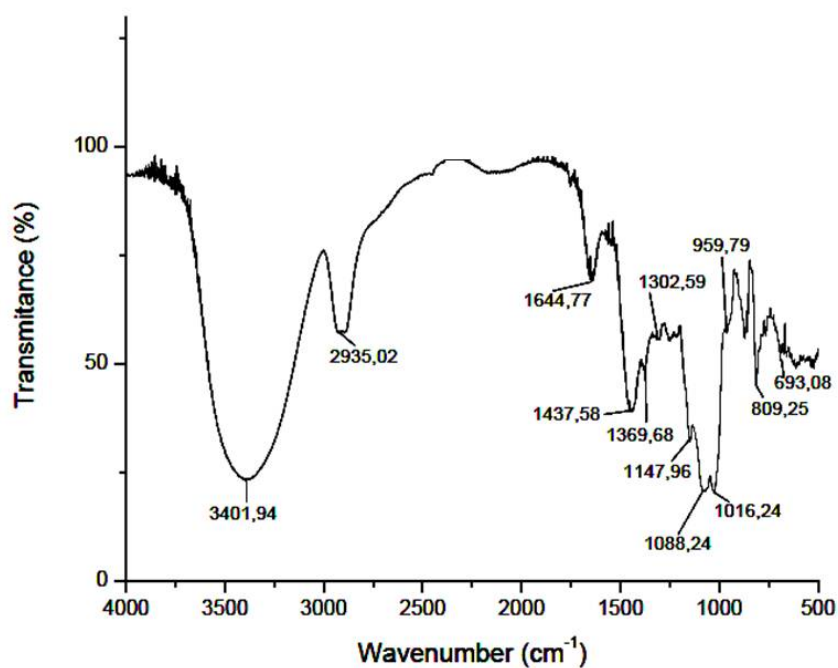
A



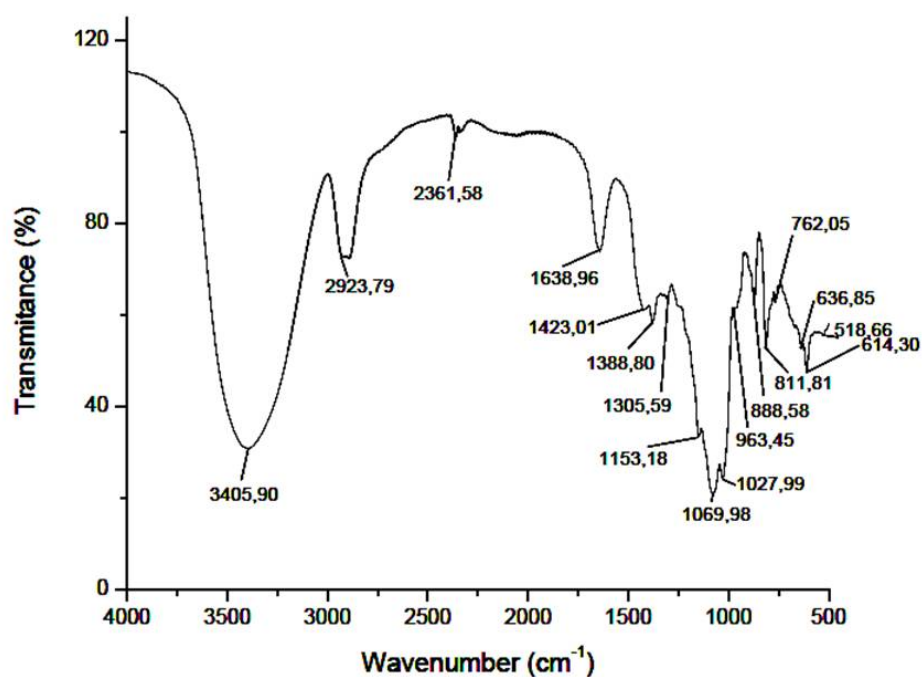
B



C



D



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Espectros de Infravermelho (FTIR) das galactomananas A) SAGM; B) SAGM:VO; C) MSAGM e D) MSAGM:VO em pastilhas de KBr. As amostras foram homogeneizadas com KBr previamente seco e então analisadas em forma de pastilhas.

Amostras dos complexos analisadas por espectrometria de absorção atômica mostraram que os complexos SAGM:VO e MSAGM:VO possuem 0,38% e 0,095% de vanádio, respectivamente.

No presente trabalho, as constantes de estabilidade calculadas por titulação potenciométrica mostraram a existência de complexos estáveis com uma porcentagem significativa em torno do pH fisiológico. A análise da complexação indica que ambas as preparações de galactomananas apresentaram perfis similares em relação ao número de espécies complexadas, com exceção do MSAGM:VO, para a qual foi detectada uma espécie adicional. No entanto, SAGM:VO apresentou quatro vezes mais vanádio do que a sua forma parcialmente hidrolisada complexada (MSAGM:VO). Considerando que os procedimentos de hidrólise e complexação modificam a estrutura 3D de um biopolímero, é possível que sítios de ligações importantes da galactomanana nativa foram destruídos, prejudicando a complexação com o oxovanádio. De acordo com estes resultados, o polímero nativo é mais favorável a ligar o oxovanádio do que a sua forma hidrolisada, embora não tenha ocorrido grande diferença nas constantes de estabilidades para os equilíbrios detectados para ambas as preparações das galactomananas com oxovanádio. Os valores das constantes de estabilidade encontrados para os equilíbrios que podem ser comparados com estudos prévios com outros polissacarídeos incluindo outras galactomananas (NOLETO *et al.*, 2002; NOLETO *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2015) mostram que as preparações de galactomananas de *S. amazonicum* formam complexos aproximadamente 1,5 vezes mais estáveis com oxovanádio.

## 6.2 TOXICIDADE DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS EM CÉLULAS HEPG2

### 6.2.1 Efeitos sobre a viabilidade e proliferação

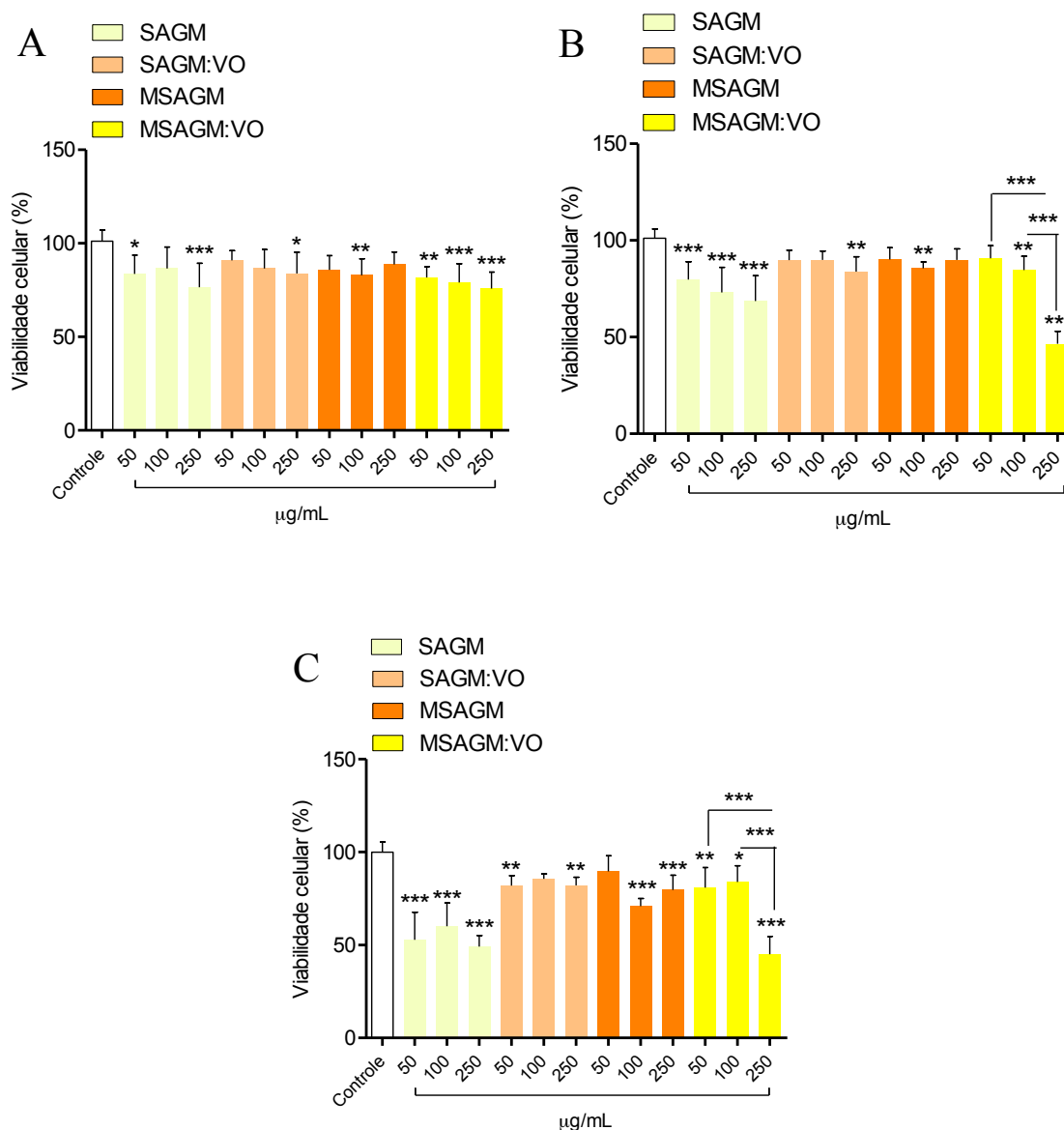
Na avaliação da citotoxicidade *in vitro* de compostos com potencial atividade anticâncer a cultura de células é muito utilizada (CHIBA *et al.*, 1998; ŚLIWKA *et al.*, 2016). Esse modelo experimental permite avaliar, por exemplo, a viabilidade e proliferação celulares frente a estes compostos (ŚLIWKA *et al.*, 2016). Diferentes métodos podem ser utilizados para avaliar estes parâmetros, entre os mais acessíveis estão o método do MTT e do Cristal Violeta. O Ensaio do MTT é baseado na redução de sais de tetrazólio em cristais de formazana, por desidrogenases de células viáveis (BANASIAK *et al.*, 1999; ŚLIWKA *et al.*, 2016).

As preparações das galactomananas apresentaram diferentes perfis em relação à diminuição da viabilidade celular nas concentrações e tempos avaliados. Após 24 h de tratamento, os biopolímeros mostraram baixa toxicidade, com maior efeito para SAGM e MSAGM:VO, que promoveram redução de ~ 24% na viabilidade das células HepG2 na concentração de 250 µg/mL em relação ao controle, células incubadas somente com o meio de cultura (FIGURA 22 A). Nesta mesma concentração, em 48 h de incubação, SAGM e MSAGM:VO mostraram-se mais citotóxicos diminuindo a viabilidade em ~34 % e ~ 54 %, respectivamente (FIGURA 22 B). Este perfil se manteve em 72 h para MSAGM:VO, porém SAGM foi mais citotóxico quando comparado ao tempo de 48 h, promovendo ~51% de redução da viabilidade destas células (FIGURA 22 C). As outras preparações (MSAGM e SAGM:VO), na concentração de 250 µg/mL, reduziram a viabilidade celular em torno de 18 % e 21 %, respectivamente em 72 h de tratamento. De acordo com os resultados mostrados na figura 22 C, a preparação nativa da galactomanana (SAGM) foi mais citotóxica em relação às demais preparações, uma vez que em 72 h afetou a viabilidade das células HepG2 em ~ 50% a partir da concentração de 50 µg/mL. Similar intensidade foi observada para MSAGM:VO, porém, em concentração 5 vezes maior (250 µg/mL) no mesmo tempo de tratamento.

O outro método para avaliação de viabilidade celular utilizado no presente estudo foi o método do cristal violeta, que considera como células viáveis, aquelas que permanecem aderidas as placas de cultura. Neste caso, a quantidade de corante incorporado é proporcional à quantidade de DNA, permitindo assim uma estimativa do número de células viáveis em cultura. Neste estudo este método foi utilizado para determinar a proliferação celular após o tratamento com os polissacarídeos e seus complexos com vanádio. Os resultados destes ensaios estão apresentados na figura 23. Assim como observado nos ensaios de viabilidade pelo método do MTT, os efeitos na proliferação das células HepG2 foram mais pronunciados após 72 h de tratamento com os biopolímeros (FIGURA 23 C). Os resultados mostram que somente o complexo MSAGM:VO (250 µg/mL) promoveu redução de ~50% na proliferação celular (FIGURA 23 C). No tempo de tratamento de 24 h (FIGURA 23 A), SAGM na concentração de 50 µg/mL reduziu a proliferação em ~25%, enquanto que MSAGM:VO na maior concentração (250 µg/mL) reduziu a proliferação em 28%. Para o tempo de tratamento de 48 h (FIGURA 23 B) os biopolímeros que reduziram a proliferação, foram SAGM e MSAGM:VO (250 µg/mL), em 25% e 36%, respectivamente.



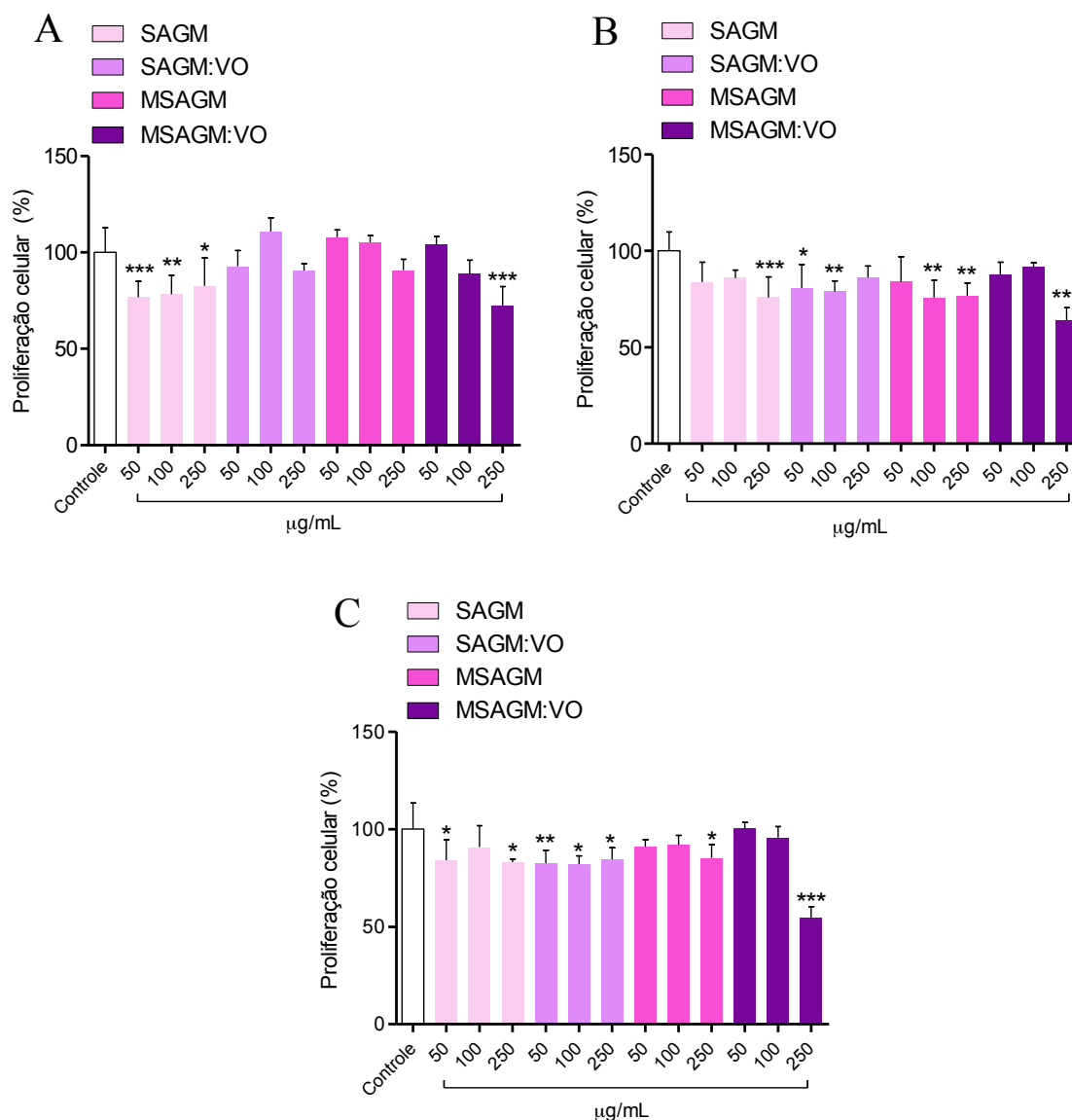
FIGURA 22 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG2.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: As células HepG2 foram cultivadas com os biopolímeros nas concentrações indicadas nas figuras; por 24h (A), 48h (B) e 72h (C), respectivamente. Os valores estão representados como média e  $\pm$  DP de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$  representam os valores significativamente diferentes em relação ao controle (células incubadas somente com o meio de cultura) e entre as concentrações.

FIGURA 23 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2



FONTE: O autor (2017).

NOTA: As células HepG2 foram cultivadas com os biopolímeros nas concentrações indicadas nas figuras; por 24h (A), 48h (B) e 72h (C), respectivamente. Os valores estão representados como média e  $\pm$  DP de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$  representam os valores significativamente diferentes em relação ao controle (células incubadas somente com o meio de cultura) e entre as concentrações.

A atividade citotóxica de galactomananas nativas e modificadas tem sido avaliada em diferentes linhagens celulares (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2006; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007; NOLETO *et al.*, 2009; JOSEPH *et al.*, 2013). Neste aspecto, Joseph e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos das galactomananas isoladas do fruto *Punica granatum* em diferentes linhagens de células tumorais, dentre estas as células HepG2. A galactomanana foi capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 em  $\sim 40\%$  na concentração 200  $\mu\text{g/mL}$  após

72 h de incubação. Os resultados obtidos por esses autores não são semelhantes aos do presente estudo em relação à galactomanana na sua forma nativa (SAGM) (FIGURA 22C), pois SAGM mostrou-se mais citotóxica, uma vez que ~ 50% de perda da viabilidade foi alcançada com 50 µg/mL em 72 h.

Em outro estudo duas preparações de galactomananas, nativa (GALMAN-A) e sua forma hidrolisada (GALMAN-B) de sementes de *M. scabrella* foram complexadas com oxovanádio (GALMAN-A:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> e GALMAN-B:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) e os efeitos foram avaliados em células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009). Ambos os complexos inibiram a proliferação celular em 60% em uma concentração dez vezes menor do que os biopolímeros não complexados. Neste caso, as preparações GALMAN-A:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> e GALMAN-B:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup> foram mais citotóxicas do que as preparações SAGM:VO e MSAGM:VO, uma vez que, as galactomananas de *M. scabrella* reduziram a viabilidade das células HeLa na concentração de 50 µg/mL em um tempo de tratamento de 48 h.

A citotoxicidade de polissacarídeos e seus complexos com oxovanádio também foi observada em células de melanoma murino (B16-F10), quando estas células foram incubadas com xiloglucanas isoladas de *Copaifera langsdorffii* e seu complexo com oxovanádio (FARIAS, 2012). A viabilidade celular foi reduzida após o tratamento com a xiloglucana nativa (XCG) em todos os tempos de tratamento (24, 48 e 72 h), chegando a 50 % de redução para todas as concentrações (25 – 300 µg/mL) e tempos avaliados. Já o seu complexo com oxovanádio (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) reduziu a viabilidade em ~ 66 % na maior concentração avaliada (300µg/mL) em 72 h. Estes resultados mostraram que o complexo (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) foi 1,3 vezes mais potente que a forma não complexada (XGC), em relação a redução da viabilidade das células B16F10, sugerindo que a presença do metal pode ter sido responsável por intensificar o efeito citotóxico. Em macrófagos peritoneais de camundongos, XGC na concentração de 100 µg/mL reduziu a viabilidade em ~30% em 48 horas de incubação (DO ROSÁRIO *et al.*, 2011). Os resultados dos estudos descritos permitem sugerir que o efeito citotóxico da xiloglucana de sementes de *C. langsdorffii* depende da estrutura do biopolímero (se complexado com o vanádio ou não) bem como do modelo celular avaliado.

Estudos indicam que a presença de metais de transição (cobre, ferro, manganês, zinco e dentre outros) em preparações ativas visando o efeito citotóxico em células tumorais pode intensificar o efeito antitumoral (FREZZA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2016). Neste aspecto, Liao *et al* (2015) isolaram e complexaram polissacarídeos contendo em sua estrutura manose, glucose e galactose do fungo *Dictyophora indusiata* com zinco (DP1-Zn) de forma a potencializar o

efeito do biopolímero. Os autores compararam os efeitos dos polissacarídeos não complexados (DP1) e complexados DP1-Zn em células MCF-7 (células de câncer de mama). Quando as células foram incubadas somente com DP1(250 µg/mL) por 48 h não foi observada redução na viabilidade, por outro lado, quando as células foram tratadas com DP1-Zn na mesma concentração e tempo de tratamento foi observada uma redução na viabilidade em ~ 20 %. Ainda neste sentido, polissacarídeos contendo em sua estrutura xilose, manose, glucose e galactose isolados de fungos *Prunella vulgaris* (P1) e complexados com Zn (II) (P1-Zn) foram incubados com células HepG2 em diferentes concentrações. Enquanto que P1 exibiu baixa toxicidade nessas células, P1-Zn foi capaz de reduzir a viabilidade de maneira dose dependente (125 – 500 µg/mL) chegando a uma redução de ~90 % na maior concentração e tempo de tratamento (48 h).

Em conjunto, estes estudos indicam que a presença do metal é importante para os efeitos citotóxicos. No presente trabalho, os resultados mostram que o biopolímero parcialmente hidrolisado complexado com oxovanádio (MSAGM:VO) é mais citotóxico do que a sua forma não complexada (MSAGM). Em contraste, a forma nativa (SAGM) foi mais citotóxica do que o complexo SAGM:VO em relação a viabilidade celular, porém semelhante em relação a proliferação celular. No tempo de 72 h, SAGM (250 µg/mL) reduziu a proliferação celular em intensidade ~ 3 vezes menor que a viabilidade. Vale ressaltar que as diferenças em relação à viabilidade e proliferação celular podem ser decorrentes do efeito das preparações no metabolismo celular, uma vez que o método do MTT avalia o metabolismo pela atividade das desidrogenases mitocondriais e o cristal violeta quantifica o número de células aderidas. Pode-se sugerir que no momento da interrupção do tratamento das células metabolicamente não ativas ainda estejam aderidas à placa de cultura, o que resultaria em maior efeito citotóxico detectado pelo método do MTT. Para investigar como as galactomananas estariam reduzindo a viabilidade e proliferação celulares, seus efeitos sobre alguns parâmetros do metabolismo das células HepG2 foram avaliados.

## 6.2.2 Efeitos em alguns parâmetros do metabolismo celular

### 6.2.2.1 Respiração – células intactas

O metabolismo das células tumorais tem peculiaridades que podem ser exploradas em novas estratégias terapêuticas (HSU; SABATINI, 2008; TENNANT *et al.*, 2010). Neste contexto, compostos que interfiram na bioenergética mitocondrial são interessantes, uma vez

que estas organelas além de fornecerem ATP para a sobrevivência celular, por outro lado, também participam de diferentes mecanismos de morte celular (GOHIL *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2016; SAROSIEK *et al.*, 2017).

A respiração foi monitorada no equipamento de respirometria de alta resolução (OROBOROS®). Os estados da respiração avaliados foram:

- 1) Basal: estado da respiração logo após a adição da suspensão celular, em meio de cultura, nas câmaras do oxígrafo, sem a adição de inibidores da cadeia respiratória e/ou desacopladores da fosforilação oxidativa;
- 2) *Leak*: estado da respiração após a adição de oligomicina, inibidor do fator  $F_0$  da ATP sintase, com consequente bloqueio da reentrada de prótons na matriz mitocondrial através deste complexo enzimático. O consumo de oxigênio neste estado da respiração deve-se a reentrada de prótons pela membrana mitocondrial interna, não acoplada a síntese de ATP;
- 3) Desacoplado: corresponde a respiração celular em resposta à adição de um desacoplador, neste estudo o FCCP, que promove o transporte de elétrons em velocidade máxima e de forma independente da síntese de ATP;
- 4) Inibido: estado que corresponde ao consumo de oxigênio na presença de oligomicina, FCCP, rotenona e antimicina A, sendo estes últimos, inibidores dos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons, respectivamente. O consumo de oxigênio neste estado não se deve a respiração mitocondrial.

Na figura 24 A é apresentada um traçado demonstrativo destes ensaios, no qual a linha cinza representa o fluxo de oxigênio ( $[pmol/(seg \times 5 \times 10^5 cels)]$ ) e a linha preta a concentração de oxigênio ( $\mu M$ ). Os estados da respiração estão descritos na figura, sendo que para a análise dos resultados os valores do fluxo de oxigênio correspondente ao estado inibido foram subtraídos dos outros estados da respiração de modo que apenas o consumo de oxigênio resultante da respiração mitocondrial fosse representado em cada estado.

Todos os polissacarídeos foram capazes de reduzir a respiração das células HepG2 (FIGURA 24 B, C E D) em 72 h de incubação. No estado basal (FIGURA 24 B), SAGM promoveu uma redução da respiração em ~85 %, na concentração de 250  $\mu g/mL$ . Do mesmo modo, sua forma complexada SAGM:VO também diminuiu a respiração basal, porém, o efeito foi menos pronunciado (~22 %). Para a galactomanana parcialmente hidrolisada (MSAGM) e sua forma complexada (MSAGM:VO) os efeitos de inibição na respiração basal também estão em concordância com os resultados do teste de viabilidade pelo MTT.

MSAGM inibiu a respiração celular em ~ 30% enquanto MSAGM:VO diminuiu a respiração basal em 63 %, 2 vezes maior que a sua forma não complexada.

Uma importante redução no estado *leak* também foi observada para todos os polímeros avaliados (FIGURA 24 C). Na concentração de 250 µg/mL, as galactomananas reduziram a respiração em torno de 30 %, exceto MSAGM:VO que foi capaz de reduzir a respiração em ~68 %, ou seja um efeito 2 vezes mais intenso que as demais preparações na mesma concentração. Para o estado desacoplado (FIGURA 24 D), o mesmo perfil de redução foi observado, chegando a 50 % para SAGM:VO e MSAGM. Já para MSAGM:VO a diminuição do consumo de oxigênio foi de ~70% na concentração de 250 µg/mL. No entanto, para a galactomanana SAGM a redução foi mais pronunciada chegando a 90%, resultado similar ao do estado basal (85% de redução).

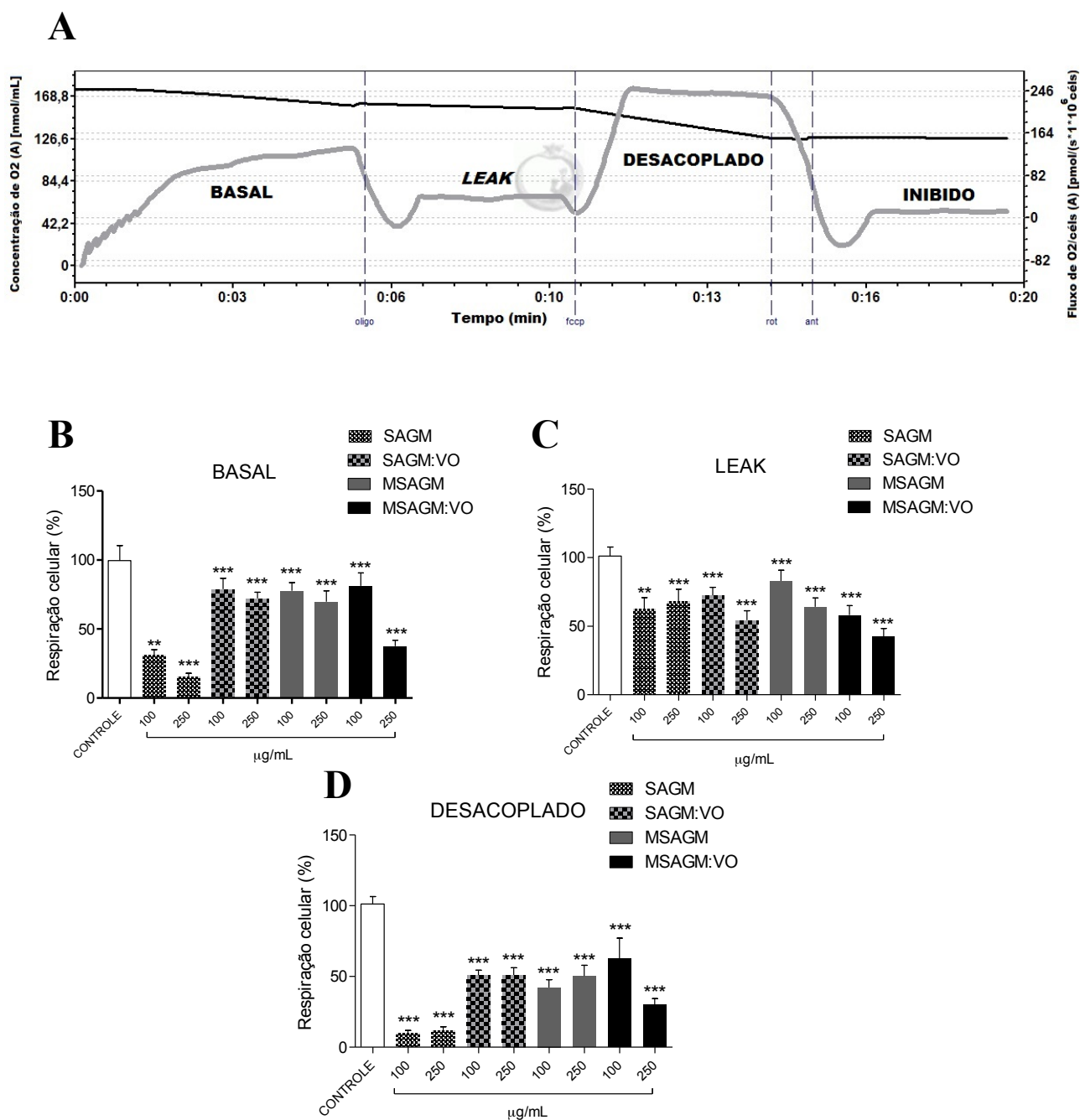
Em conjunto estes resultados mostram que os biopolímeros SAGM e MSAGM:VO reduzem significativamente a respiração dessas células em relação a SAGM:VO e MSAGM.

A interferência de polissacarídeos na respiração celular foi também descrita por Farias (2012). A autora observou que células B16-F10 intactas tiveram um importante aumento na respiração quando incubadas com xiloglucana de *C. langsdorffi* (XGC) em concentração de 10-250 µg/mL. Este aumento foi observado em todos os estados da respiração, alcançando ~132% em relação ao controle no estado desacoplado, indicando que a XGC tem efeito desacoplador, efeito oposto ao observado no presente estudo. Por outro lado, no presente estudo, a galactomana nativa e não complexada promoveu uma significativa inibição da respiração, sugerindo que o efeito sobre a respiração é dependente da estrutura do polissacarídeo. Em relação ao complexo com o metal, Farias (2012) verificou que o tratamento com o polímero complexado ao vanádio (XGC:VO<sup>2+</sup>/VO<sup>3+</sup>) resultou em uma importante redução no consumo de oxigênio nas células B16-F10 em todos os estados da respiração celular alcançando ~ 67% de redução no consumo de oxigênio na concentração de 25 µg/mL, em relação ao controle. Os resultados destes estudos sugerem que os efeitos dos polissacarídeos sobre a respiração das células depende da estrutura do biopolímero, da concentração do metal, bem como do tipo celular estudado.

Em outro estudo, Silveira (2010), observou que a respiração de células HeLa não permeabilizadas e incubadas com xiloglucanas isoladas de *Hymenaea courbaril* (XGJ), não era afetada pela presença da xiloglucana. No entanto, após a permeabilização das células com digitonina, um importante detergente capaz de interagir especificamente com o colesterol das membranas (VERCESI *et al.*, 1991), a XGJ promoveu uma redução na respiração celular em torno de 60% (200 µg/mL).

Para aprofundar o entendimento dos efeitos das preparações das galactomananas na respiração celular, foram realizados ensaios com células HepG2 permeabilizadas com digitonina. Em células intactas muitas vezes não é possível avaliar certos parâmetros funcionais das mitocôndrias que são considerados importantes, por exemplo, as respostas mitocondriais a vários substratos tais como glutamato/malato, succinato e ADP. Por sua vez, a permeabilização das células permite avaliar disfunções localizadas na cadeia respiratória, por exemplo, valores baixos de respiração a partir do complexo I em níveis normais nos complexos II e IV, sugere um dano específico no complexo I (VERCESI *et al.*, 1991; KUZNETSOV *et al.*, 2008).

FIGURA 24 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2 INTACTAS.



FONTE: O autor (2017)

NOTA: A) Traçado representativo da respiração das células HepG2 em meio de cultura (DMEM Alta Glucose). No traçado observam-se os quatro estados da respiração (Basal, Leak, Desacoplado e Inibido) resultantes das adições descritas no texto. Linha preta - concentração de O<sub>2</sub> e linha cinza - fluxo de O<sub>2</sub>. OLIGO: Oligomycin; FCCP; ROT/ANT: Rotenona e Antimicina. O consumo de oxigênio foi determinado na ausência de inibidores e desacopladores (BASAL) (B), na presença de oligomycin (LEAK) (C) e na presença de FCCP (DESACOPLADO) (D). O 100% do controle representa 161,02; 33,75 e 352,87 pmols/seg/1x10<sup>6</sup> células, para o estado BASAL, LEAK e DESACOPLADO, respectivamente. Os valores representam a média ± DP de seis experimentos independentes. \*, \*\* e \*\*\* são os valores de p < 0,05; p < 0,001 e p < 0,0001, indicando os valores significativamente diferentes do controle (ausência do polissacarídeo).



#### 6.2.2.2 Respiração – células permeabilizadas

Para permeabilizar as células HepG2, após o tratamento de 72 h com os polissacarídeos SAGM e MSAGM:VO, foi utilizada a digitonina. No entanto, antes destes ensaios serem realizados foi necessário estabelecer a concentração ótima de digitonina e tempo ideal de incubação para realizar a permeabilização somente da membrana plasmática e não das organelas celulares, como as mitocôndrias. A quantidade de colesterol varia de acordo com o tipo de membrana lipídica. A membrana celular possui 0,5 mol de colesterol por molécula de fosfolípido, enquanto que a membrana do retículo endoplasmático tem uma razão molar de 0,1 mol e as membranas externa e interna mitocondriais contém ainda menos colesterol, com uma razão molar de 0,07 e 0,01, respectivamente (SALABEI *et al.*, 2014). Com base nestas relações, faz-se necessário estabelecer a concentração adequada de digitonina para cada tipo celular, e o mais importante, é que não ultrapasse de 50 µg/mL de digitonina para que não ocorra a permeabilização das outras membranas lipídicas, no caso as membranas da mitocôndria e retículo endoplasmático (KUZNETSOV *et al.*, 2008).

Neste trabalho, para determinar a concentração ótima de digitonina para as células HepG2, foram realizados ensaios utilizando concentrações de 5 a 40 µg/mL de digitonina/1 x 10<sup>6</sup> células. Porém, serão apresentados somente os resultados referentes à condição ideal com 20 µg/mL. A figura 25 A mostra um traçado demonstrativo nestas condições e sem adição dos polissacarídeos. Após 10 min de incubação com a digitonina (20 µg/mL) as células HepG2 foram adicionadas às câmaras do oxígrafo. Observa-se o aumento do consumo de oxigênio após a adição dos substratos para o complexo I (malato/glutamato). Este aumento foi intensificado após a adição de ADP. Em seguida, a adição de rotenona (inibidor do complexo I) promoveu uma redução na respiração, que retornou após a adição de succinato (substrato para o complexo II). A última adição foi de antimicina (inibidor do complexo III), reduzindo novamente o consumo de oxigênio.

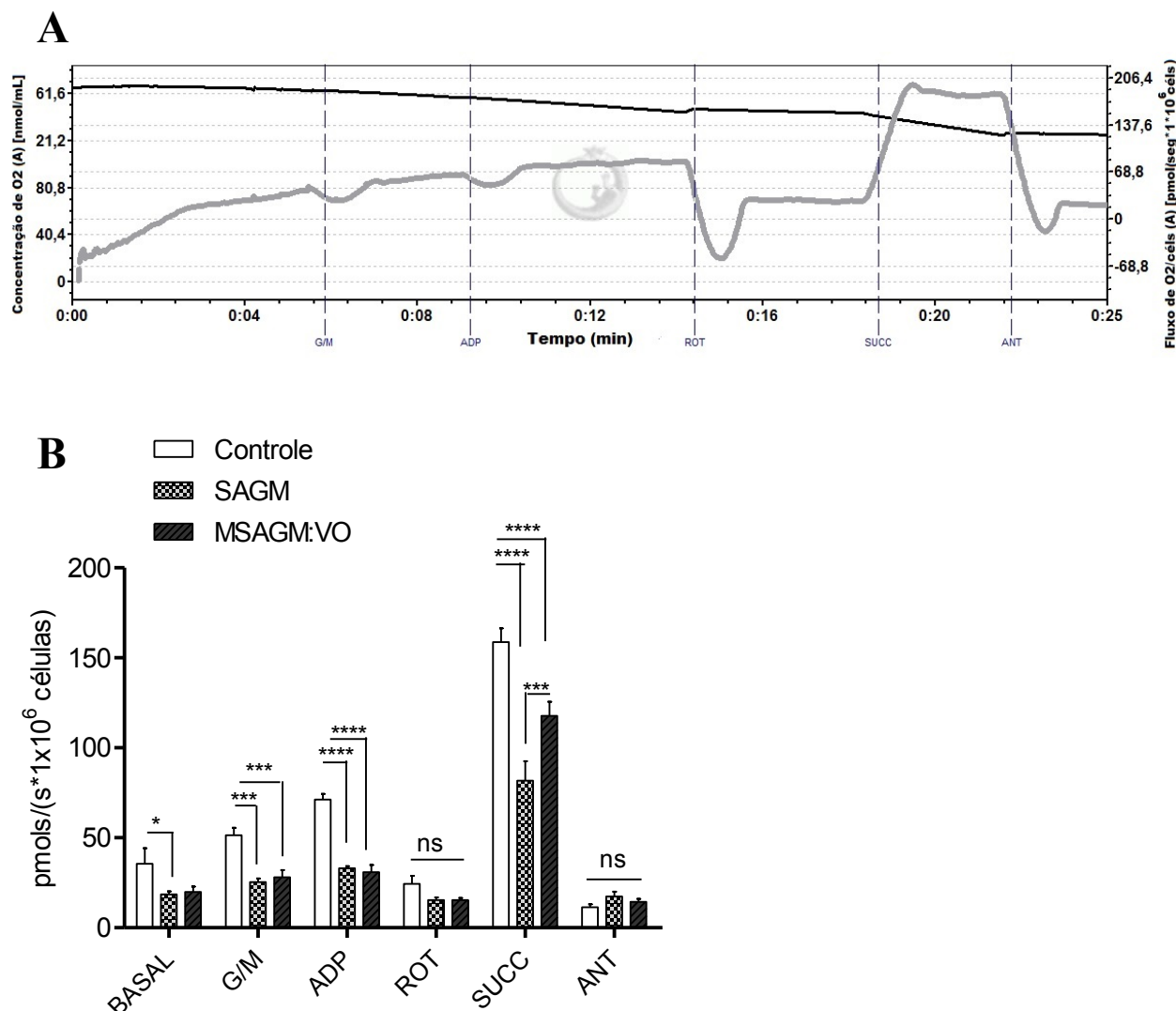
Após a otimização da metodologia de permeabilização das células HepG2, foram realizados os experimentos com as galactomananas nas mesmas condições citadas acima. Para este experimento foram escolhidos SAGM e MSAGM:VO, que promoveram a maior inibição da respiração em células intactas. Após o tratamento (250  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h) as células foram permeabilizadas e imediatamente transferidas para as câmaras do oxígrafo para o início dos experimentos.

Observa-se na figura 25 B que ambos os biopolímeros promoveram uma significativa inibição da respiração das células HepG2 permeabilizadas, já observada mesmo antes da adição dos substratos e que se manteve após a adição de glutamato e malato (substratos para o complexo I). Em relação ao controle, a respiração foi reduzida em ~50% para ambas as galactomananas, o mesmo ocorrendo após a adição de ADP. A respiração também foi reduzida quando o substrato adicionado foi o succinato (substrato para o complexo II), sendo a redução de 49% para SAGM e 27% para a MSAGM:VO. Este resultado sugere uma ação diferencial dos polímeros quando a via de entrada dos elétrons é o complexo II.

A interpretação destes resultados é complexa, pois, diferentemente dos estudos com mitocôndrias isoladas, nas células em suspensão não há um controle absoluto dos níveis de ATP/ADP, uma vez que os processos de síntese e hidrólise de ATP dependerão do balanço energético celular. Porém, o fato de observar-se uma redução na respiração celular, tanto na ausência quanto na presença de substratos, sugere que os polímeros comprometam a eficiência do transporte elétrons e, desta forma, a síntese de ATP. Neste contexto, Cunha (2013) demonstrou que SAGM promoveu (~25%) o aumento dos níveis de lactato e redução dos níveis de piruvato em células HepG2. Assim, é possível sugerir que esteja ocorrendo um desvio para a via glicolítica nestas células, de forma a compensar a disfunção mitocondrial e garantir a provisão de ATP. Ainda, este desvio para a produção de lactato, garantiria o suprimento necessário de  $\text{NAD}^+$  para sustentar a ativação da via glicolítica. Estas hipóteses devem ser avaliadas por ensaios específicos, como por exemplo, a avaliação da atividade da lactato desidrogenase e de enzimas da via glicolítica.

Sendo assim, SAGM e MSAGM:VO parecem interferir nas funções mitocondriais relacionadas à provisão de energia, levando uma redução na respiração das células HepG2 e, conseqüentemente, da oxidação de NADH e  $\text{FADH}_2$  na cadeia respiratória.

FIGURA 25 - EFEITO DAS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS NA RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS HepG2 PERMEABILIZADAS.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Traçado representativo da respiração das células HepG2 permeabilizadas com a digitonina (20  $\mu\text{g/mL}/1 \times 10^6$  células). As células HepG2 foram incubadas em meio do oxígrafo, conforme descrito no item 4.10.7 da seção de material e métodos. No traçado observam-se a respiração das células HepG2 após a adição de substratos e inibidores da cadeia de transporte de elétrons. Linha preta - concentração de  $\text{O}_2$  e linha cinza - fluxo de  $\text{O}_2$ . B) Respiração das células HepG2 permeabilizadas com digitonina tratadas com e sem os polissacarídeos SAGM e MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ). BASAL: respiração sem a adição de inibidores ou desacopladores; G/M: Glutamato e Malato, substratos para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons; ROT: rotenona, inibidor do complexo I; SUCC: succinato, substrato para o complexo II da cadeia respiratória e ANT: antimicina A, inibidor do complexo III. Os valores representam a média  $\pm$  o EP de quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*  $p < 0,00001$  são os valores significativamente diferentes em relação ao controle.

Os efeitos da xiloglucana (XGC) e seu complexo com oxovanádio no consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram avaliados por Fernandes (2016). A atividade da succinato desidrogenase (complexo II da cadeia respiratória), foi inibida pelos polímeros na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ . XGC promoveu uma inibição de  $\sim 19\%$  enquanto

sua forma complexada (XGC:VO) foi capaz de inibir em ~30% a atividade deste complexo, uma diferença de ~1,6 vezes em relação a forma não complexada. Pode-se sugerir que a presença do metal tenha influenciado a inibição, uma vez que há descrito efeitos inibitórios de compostos de vanádio no complexo II da cadeia respiratória de mitocôndrias de fígado de rato (ZHAO *et al.*, 2010). No presente estudo, os polímeros SAGM e MSAGM:VO também promoveram uma importante redução na respiração, quando a via de entrada dos elétrons foi o complexo II (succinato como substrato oxidável), o que também poderia ser resultado da inibição deste complexo. No entanto, a inibição pelo complexo MSAGM:VO não foi superior a galactomanana nativa não complexada, sugerindo que neste caso a presença do metal não foi determinante para o efeito (FIGURA 26 B).

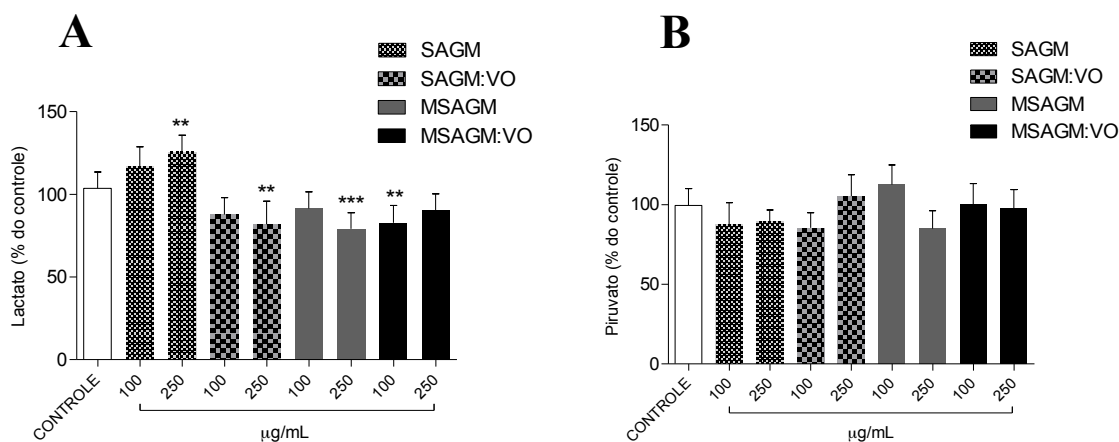
O estudo de Zhao e colaboradores (2010) mostrou que além de interferirem no complexo II da cadeia respiratória, os compostos de vanádio ( $\text{VOSO}_4$ ,  $\text{NaVO}_3$  e complexos destes com ligantes orgânicos) promoveram estresse oxidativo mediado pelo aumento de ROS, *swelling* mitocondrial, abertura do poro de transição mitocondrial e liberação do citocromo c. Em outro estudo, o metavanadato de sódio (vanádio nos estados V ou IV) *in vitro* e *in vivo* foi capaz de inibir os complexos I, II e III da cadeia respiratória mitocondrial, o que causaria um aumento nas espécies reativas de ROS, redução de níveis de ATP e liberação do citocromo c (HOSSEINI *et al.*, 2013).

Os efeitos biológicos desencadeados por polissacarídeos são resultado da interação destes biopolímeros (ligantes) com moléculas receptoras na superfície celular (OHYA *et al.*, 2001). A partir desse contato podem ocorrer diferentes mecanismos, que muitas vezes não são fáceis de avaliar, como por exemplo, definir seu sítio de ligação ou se a molécula é ou não internalizada. Os ensaios com as células HepG2 permeabilizadas com digitonina, embora não esclareça a co-localização celular das galactomananas confirmam que estes biopolímeros, comprometem a fosforilação oxidativa indicando que as mitocôndrias são um dos seus alvos de ação. As duas hipóteses são interessantes uma vez que estas organelas estão relacionadas a diferentes mecanismos de morte celular, que incluem tanto o estado de fluidez da membrana mitocondrial interna, como a eficiência do transporte de elétrons na cadeia respiratória (PELICANO *et al.*, 2003; KROEMER *et al.*, 2009; SUN; PENG, 2009; INDRAN *et al.*, 2011; TAIT; GREEN, 2013). De qualquer forma, ao comprometer as funções destas organelas, estes biopolímeros poderiam induzir a morte das células HepG2, uma vez que as mitocôndrias estão relacionadas com diferentes mecanismos de morte celular.

### 6.2.2.3 Efeitos nos níveis de lactato, piruvato e ATP

Os resultados da respiração das células HepG2 intactas e permeabilizadas após a incubação com as galactomananas sugerem que os efeitos destes atuam na mitocôndria. Assim, com o objetivo de observar possíveis alterações na via glicolítica em resposta a inibição da respiração, foram determinados os níveis de lactato e piruvato, no sobrenadante das células HepG2 após 72 h de tratamento com as preparações das galactomananas. Na figura 26, pode-se observar que SAGM (250 µg/mL) promoveu um aumento nos níveis de lactato em ~ 25 %, o que pode sugerir à ativação da glicólise anaeróbia em resposta a inibição da respiração celular. Esta preparação foi a mais efetiva na inibição da respiração das células intactas neste tempo e concentração. Aumento nos níveis de lactato em resposta a um comprometimento da função mitocondrial é esperado, uma vez que as células tentarão sobreviver obtendo energia pela via glicolítica (CAIRNS; MAK, 2016). Por outro lado, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO que também inibiram a respiração celular, porém em menor intensidade diminuíram os níveis de lactato em 19, 21 e 10 %, respectivamente. Embora esta diminuição nos níveis de lactato tenha sido relativamente baixa, principalmente para MSAGM:VO, que depois do SAGM foi o mais efetivo na inibição da respiração, pode sugerir que além das mitocôndrias as galactomananas podem estar comprometendo a via glicolítica ou a conversão do piruvato a lactato. Vale destacar que a isoforma da LDH-A nas células tumorais favorece a formação de lactato (MARCHIQ; POUYSSÉGUR, 2015). O discreto aumento nos níveis de piruvato observado na presença de SAGM:VO e MSAGM (FIGURA 26 B) e a diminuição de lactato corroboram para uma possível inibição da LDH-A por estes biopolímeros.

FIGURA 26 - NÍVEIS DE LACTATO E PIRUVATO NO SOBRENADANTE DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Os níveis de lactato (A) e piruvato (B) foram monitorados de forma indireta através da formação ou oxidação do NADH a partir do sobrenadante das células HepG2 tratadas por 72 h com as galactomananas (SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO) e os resultados foram ajustados para porcentagem. O grupo controle, representado por 100 % para lactato indica:  $54,12 \pm 3,9$  mol/ $5 \times 10^5$  cel e para piruvato indica:  $28,44 \pm 3,8$  mol/ $5 \times 10^5$  cel. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP de seis experimentos realizados em duplicata. (ANOVA, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Estudos relacionados ao metabolismo celular tumoral e polissacarídeos são escassos na literatura. No entanto, essa investigação tem sido realizada no laboratório de oxidações biológicas e cultivo celular desta Universidade, com diferentes linhagens celulares (SILVEIRA, 2010; FARIAS, 2012).

A incubação da xiloglucana isolada de *H. courbaril* (XGJ) na concentração de 200 µg/mL (SILVEIRA, 2010) em células HeLa promoveu um aumento na produção de lactato nessas células, chegando a 26% em relação ao controle, porém as condições experimentais foram diferentes do presente estudo, uma vez que a incubação com XGJ foi de 48 h e os ensaios foram monitorados após a adição de 5 mM/L de glucose onde alíquotas foram coletadas no períodos entre 0 e 60 min. Os níveis de piruvato após a incubação com XGJ foi reduzida em 20 %. A autora atribuiu esses efeitos à interferência dos biopolímeros nas funções mitocondriais, uma vez que a capacidade respiratória dessas células foi reduzida na presença de XGJ, o que poderia resultar no acúmulo de coenzimas reduzidas no citosol e consequente redução do piruvato a lactato.

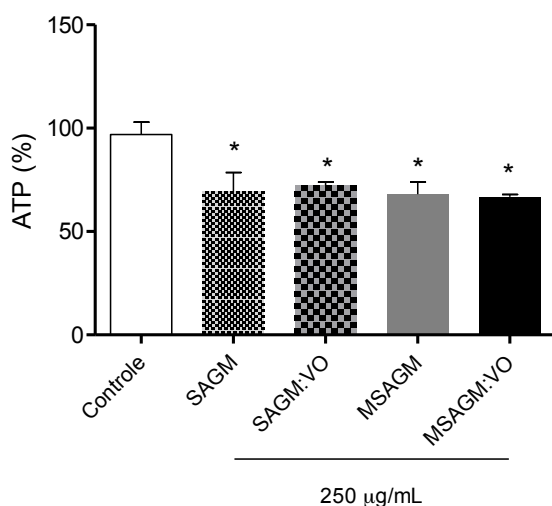
Em células B16-F10, o tratamento com a xiloglucana (XGC) na sua forma nativa provocou um aumento na produção de lactato de ~14 % e ~17 % para as concentrações de 10 e 25 µg/mL, respectivamente, em relação ao controle (FARIAS, 2012). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na produção de piruvato, resultado também

observado no presente estudo. A autora também constatou que ao contrário do observado para XGC, o tratamento com a  $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$  não alterou de maneira significativa a produção de lactato pelas células B16-F10. No entanto, a presença do complexo provocou uma importante diminuição na produção de piruvato, em torno de 34 % e 22,5 %, para as concentrações de 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, em relação ao controle. Segundo a autora, a  $XGC:VO^{2+}/VO^{3+}$  parece exercer um efeito na via glicolítica. A redução na respiração observada naquele estudo pode ser representada pela diminuição na produção de piruvato. Uma vez que não ocorre um aumento concomitante na produção de lactato, a via glicolítica poderia estar sendo inibida pela ação do complexo.

Neste trabalho, o aumento da produção de lactato pelas células HepG2 na presença de SAGM foi maior quando comparado ao observado para as células B16-F10 na presença de XGC (FARIAS, 2012). No entanto, vale ressaltar que são linhagens distintas, além de serem polissacarídeos diferentes, SAGM estava em concentração 10 vezes maior que XGC. Em princípio estes resultados sugerem que as preparações das galactomananas possuem diferentes alvos de ação. Para esclarecer estes efeitos, outros ensaios devem ser realizados como a atividade de enzimas da via glicolítica e análise metabolômica.

Os níveis de ATP também foram monitorados após a incubação das preparações das galactomananas em células HepG2. As células foram tratadas com 250  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h com os biopolímeros. Pode-se observar que todas as preparações das galactomananas diminuíram os níveis de ATP em ~30 % em relação ao controle, mas não houve diferenças entre elas (FIGURA 27).

FIGURA 27 - NÍVEIS DE ATP DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A concentração de ATP foi monitorada pela luminescência segundo instruções do fabricante do *kit* como descrito no item 5.6.4 da seção de materiais e métodos. As células HepG2 foram tratadas com as preparações de galactomanana(SAGM, SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO) na concentração de 250 µg/mL por 72 h. O 100 % do controle indica: 0,055 µmol/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. (ANOVA, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Para melhor visualizar os efeitos das preparações das galactomananas nos parâmetros metabólicos avaliados, os resultados foram reunidos na tabela 2. Observa-se que SAGM foi o único biopolímero capaz de elevar os níveis de lactato, sugerindo um desvio do metabolismo energético para a via glicolítica, como resultado da redução da respiração. No entanto, este desvio não foi suficiente para manter os níveis de ATP que estão reduzidos.

Em relação as outras galactomananas SAGM:VO, MSAGM e MSAGM:VO, os níveis de lactato e de ATP foram diminuídos, devido a inibição da respiração e, possivelmente, da via glicolítica. Hosseini e colaboradores (2013) demonstraram que a adição de compostos de vanádio (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, causou a redução dos níveis de ATP em ~ 42 %. Os autores relacionaram esses resultados com a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) como resultado do aumento dos níveis de ROS, em decorrência da inibição da cadeia de transporte de elétrons.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS AVALIADOS

Galactomananas (250 µg/mL)	Respiração (Basal/ leak/desacoplado) %			Lactato %	Piruvato	ATP %
SAGM	↓75±0,8	↓32±3,1	↓88±0,8	↑25%±3,3	ns	↓31±8,9
SAGM:VO	↓28±1,5	↓46±2,4	↓49±1,7	↓19±4,7	ns	↓28±1,5
MSAGM	↓31±2,8	↓36±2,2	↓50±2,6	↓21±3,2	ns	↓32±5,8
MSAGM:VO	↓63±1,4	↓58±2,1	↓70±1,4	↓10±3,2	ns	↓34±1,0

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Dados em porcentagem ± DP dos experimentos de: respiração; níveis de lactato e piruvato; e ATP relacionados com os valores do controle (100%) de cada experimento das células HepG2 tratadas com os biopolímeros na concentração de 250 µg/mL por um período de 72 h. ns = não significativo.

### 6.2.3 Efeitos no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

A redução da respiração celular, bem como a diminuição nos níveis de ATP, sugere que as mitocôndrias são alvos da ação das galactomananas, especialmente, as galactomananas na forma nativa (SAGM) e parcialmente hidrolisada complexada com oxovanádio (MSAGM:VO). Sendo assim, o próximo parâmetro avaliado foi o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), principal componente da força próton motora (GNAIGER, 2001; GOTTLIEB *et al.*, 2003; KALBACOVA *et al.*, 2003).



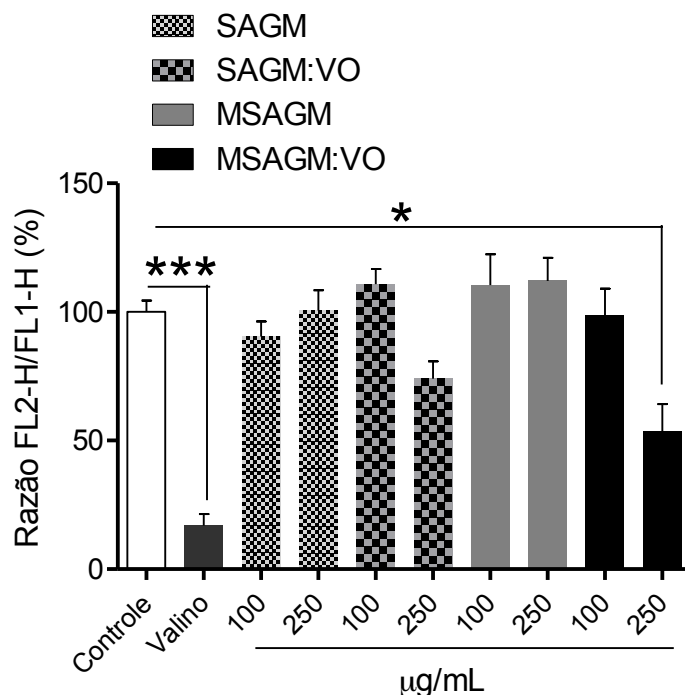
Alguns estudos têm mostrado que a redução ou colapso do potencial de membrana mitocondrial gera uma alteração estrutural na mitocôndria, levando a liberação do citocromo c e consequentemente a indução da morte celular por apoptose, devido à ativação das caspases (GOTTLIEB *et al.*, 2003; TAIT; GREEN, 2013; GREEN, 2017).

Neste estudo o potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 foi avaliado após 72 h de incubação com as preparações das galctomananas nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . Na figura 28, pode ser observado uma redução do  $\Delta\Psi_m$  de  $\sim 86\%$ , quando as células HepG2 foram incubadas com valinomicina, um ionóforo de potássio capaz de promover o colapso do  $\Delta\Psi_m$ , utilizado como controle positivo. Em relação às galactomananas, somente a preparação MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ) promoveu redução estatisticamente significativa do  $\Delta\Psi_m$  em  $\sim 50\%$  em relação ao controle. Embora o resultado apresentado por SAGM:VO não foi estatisticamente significativo, este composto também promoveu uma redução no potencial.

MSAGM:VO causou uma redução de  $\Delta\Psi_m$  e este efeito está em concordância com alguns estudos com outros compostos de vanádio, incluindo polissacarídeos (STRIANESE *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2015; CUI *et al.*, 2016). Wu *et al.* (2014) mostraram que SOV (ortovanadato de sódio) promoveu o colapso do potencial da membrana mitocondrial e a morte celular por apoptose em células HepG2.

Recentemente, foram avaliados polissacarídeos de *Pleurotus nebrodensis* (PNA-2) (CUI *et al.*, 2016) e *Andrographis paniculata* (APWP) (ZOU *et al.*, 2015) em células HepG2 em diferentes concentrações. Cui e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos de polissacarídeos de *P. nebrodensis* (PNA-2) sobre o  $\Delta\Psi_m$  utilizando a rodamina 123 em células HepG2 após 48 h de tratamento. O  $\Delta\Psi_m$  foi reduzido de forma dose dependente (12,5; 62,5 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ), o que levou os autores a sugerirem que PNA-2 induziu a morte celular por apoptose devido a despolarização da membrana mitocondrial. Zou *et al.* (2015) incubaram células HepG2 com polissacarídeos de *A. paniculata* (APWP) e, após 48 h, observaram uma diminuição no  $\Delta\Psi_m$ . Estes efeitos foram desencadeados por concentrações muito mais elevadas (400 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ) do que as utilizadas no presente estudo.

FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ) DAS CÉLULAS HepG2 INCUBADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^6$ ), tratadas e após o período de 72 h foram incubadas com a sonda JC-1 conforme descrito no item 5.6.8 da seção de material e métodos. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  e \*\*\*  $p < 0.0001$  são os valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo.

#### 6.2.4 Efeitos nos níveis de ROS intracelulares

Sabe-se que as mitocôndrias em condições fisiológicas geram espécies reativas de oxigênio (ROS), que participam da sinalização celular e quando em altos níveis causam a condição denominada de estresse oxidativo (SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014).

Os níveis de ROS intracelulares foram monitorados após o tratamento de 72 h com as galactomananas. Na figura 29 A, observa-se que MSAGM:VO promoveu o aumento nos níveis de ROS em ~149 % em comparação ao controle negativo. Por outro lado, SAGM:VO e MSAGM tiveram um efeito menos pronunciado, aumentando os níveis de ROS em ~31 % e 42 %, respectivamente. Na concentração de 250 µg/mL SAGM não alterou os níveis das espécies reativas de oxigênio.

Uma forma de investigar se a redução na viabilidade celular estaria acontecendo devido aos elevados níveis ROS, seria realizar um pré-tratamento com NAC (*N*-acetilcisteína), um importante antioxidante. NAC é capaz de atravessar as membranas celulares sendo desacetilado originando a glutathione reduzida (GSH) e a L-cisteína

(CUSIMANO *et al.*, 2015). O NAC é a fonte de grupos sulfidrilas nas células e atua como *scavenger* de ROS, como por exemplo,  $H_2O_2$ .

Para este ensaio, NAC (10 mM) foi incubado com as células duas horas antes do tratamento com as galactomamamas. Os resultados apresentados na figura 29 B mostram que para as células tratadas com as galactomananas MSAGM:VO, o pré-tratamento com o NAC preveniu a redução da viabilidade celular. Para MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ), o aumento da viabilidade celular foi  $\sim 55\%$ , alcançando a mesma porcentagem de viabilidade das células somente em meio de cultura, que foi considerado 100 % de viabilidade (FIGURA 29 B).

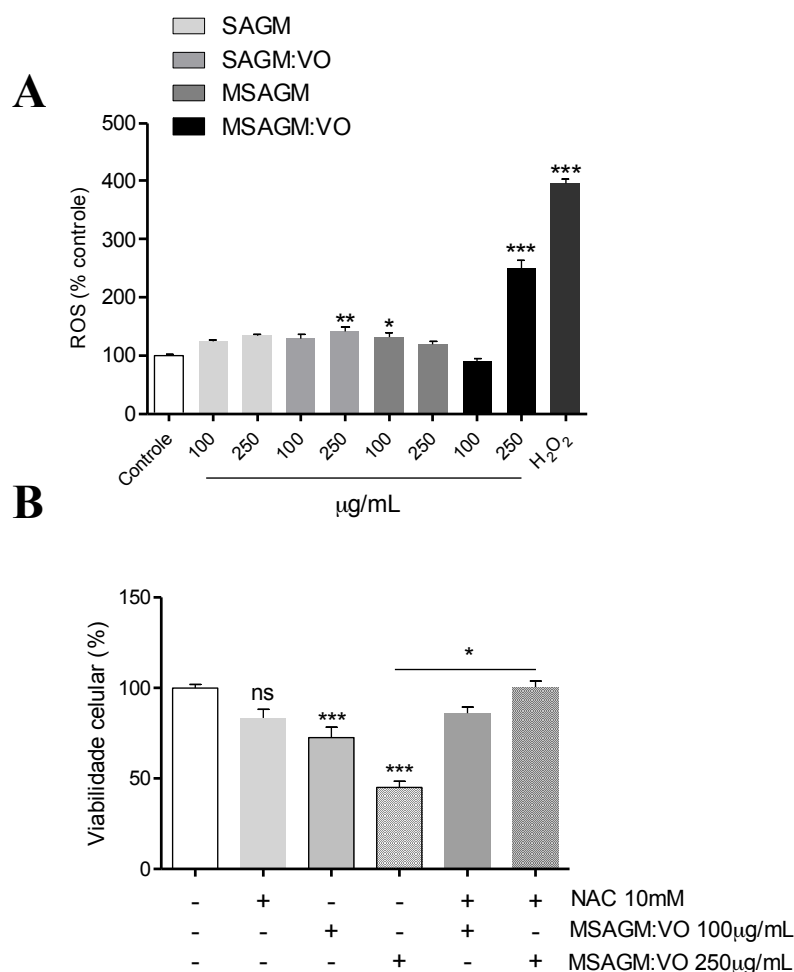
Tem sido proposto que a interconversão entre os estados de oxidação do vanádio V(IV) e V(V) no meio biológico gera espécies reativas de oxigênio (TSARAMYRSI *et al.*, 2001; YANG, 2003; WANG *et al.*, 2010). Neste sentido, vários efeitos observados por compostos de oxovanádio, incluindo a atividade antitumoral têm sido atribuídos na habilidade desses compostos em promover o estresse oxidativo (TSARAMYRSI *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2010). No presente estudo, foi observado que o tratamento com a galactomanana MSAGM:VO levou a um aumento de ROS que corrobora com os resultados obtidos em relação a redução do  $\Delta\Psi_m$ , bem como com a inibição da respiração celular. É possível que estes efeitos sobre as mitocôndrias sejam responsáveis pela citotoxicidade induzida pelo complexo MSAGM:VO uma vez que o aumento do nível de ROS e a perda de  $\Delta\Psi_m$  estão envolvidos na morte celular (GOTTLIEB *et al.*, 2003; SABHARWAL; SCHUMACKER, 2014).

O envolvimento da produção de ROS nos efeitos induzidos por MSAGM:VO é corroborado pelas determinações de viabilidade das células HepG2 pré-tratadas com NAC (TSARAMYRSI *et al.*, 2001; YANG, 2003; WANG *et al.*, 2010). A prevenção da perda de viabilidade celular por NAC sugere que o biopolímero inibe o crescimento de células HepG2 através de uma via dependente de ROS, aumentando os níveis intracelulares de GSH, por exemplo.

Os efeitos tóxicos da galactomanana nativa (SAGM) e de sua forma parcialmente hidrolisada complexada com oxovanádio (MSAGM:VO) nas células HepG2 parecem ocorrer através de vias diferentes. Além disso, os resultados sugerem que a presença de vanádio pode ser essencial para promover o aumento dos níveis de ROS, uma vez que SAGM:VO, embora em menor intensidade do que MSAGM:VO, também aumentou os níveis de ROS nas células HepG2. Tem sido sugerido, que a geração de ROS através da reação com íon metálico com  $H_2O_2$  não é limitado somente ao  $Fe^{2+}$ . Sendo assim, a reação de Fenton pode ser também atribuída a outros metais, como por exemplo, o cobre, cobalto e o vanádio que assim como o

ferro, podem reagir com o peróxido de hidrogênio e formar um dos mais reativos dos radicais, o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) que consequentemente pode gerar diversos danos às células, incluindo a oxidação de proteínas, bem como a quebra do DNA, tornando as células tumorais vulneráveis à morte celular (JUNGWIRTH et al., 2011; HOSSEINI et al., 2013).

FIGURA 29 – NÍVEIS DE ROS DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM AS PREPARAÇÕES DAS GALACTOMANANAS E VIABILIDADE CELULAR APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Efeitos das galactomananas SAGM, SAGM:VO, MSAGM, MSAGM:VO em relação aos níveis intracelulares de ROS das células HepG2. As células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$ ), tratadas e então incubadas com a sonda DCFH-DA. Os valores representam a média  $\pm$  o DP de três experimentos independentes. \*, \*\* e \*\*\* são os valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle negativo. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi usado como controle positivo. Os dados obtidos foram normalizados pelo método do MTT; B) Efeito do pré-tratamento com NAC (N-acetilcisteína) na viabilidade das células HepG2 tratadas com as galactomananas MSAGM:VO. Após 72 h de tratamento foram realizadas a análise da viabilidade celular pelo método do MTT. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*, \*\* e \*\*\* são os valores de  $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle (células somente com o meio de cultura).

### 6.3 EFEITOS DA GALACTOMANANA PARCIALMENTE HIDROLISADA E COMPLEXADA COM OXOVANÁDIO (MSAGM:VO) NAS CÉLULAS HEPG2 EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA

A significativa redução na viabilidade e proliferação das células HepG2 pelas galactomananas, bem como o importante papel da disponibilidade de oxigênio para a sobrevivência das células tumorais e seus mecanismos de resistência à quimioterapia, os efeitos de MSAGM:VO após tratamento de 72h foram avaliados em condições de normóxia (21 % de oxigênio) e hipóxia (1% de oxigênio) comparativamente. Estes experimentos foram realizados durante o doutoramento sanduiche, na *Université de Nice - Sophia Antipolis* em colaboração com o Instituto de Pesquisa de Câncer e Envelhecimento (*IRCAN*), sob supervisão dos doutores Jacques Pouyssegur e Nathalie Mazure.

#### 6.3.1 Proliferação celular

Em condições de normóxia MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ) após 72 h de incubação, foi capaz de diminuir a viabilidade celular, reduzir o potencial de membrana mitocondrial, elevar os níveis de ROS e diminuir os níveis de ATP. Estes resultados, em especial a redução do  $\Delta\Psi\text{m}$ , sugerem que as células podem estar em processo de morte celular. Assim, em condições de normóxia e hipóxia foi avaliado a ocorrência de morte celular por apoptose nas células HepG2 na presença de MSAGM:VO, na concentração e tempo de tratamento já estabelecidos.

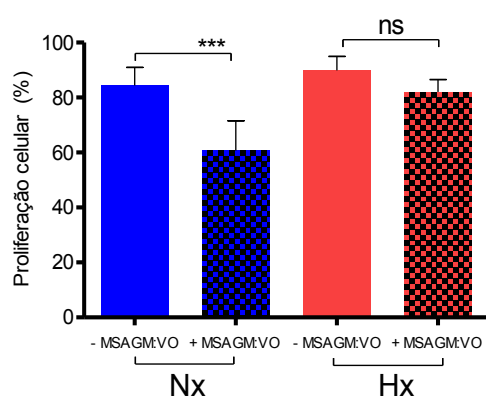
Os dados obtidos referentes à proliferação das células HepG2 em condição de normóxia e hipóxia estão apresentados na figura 30. Como pode ser observado, em condições de normóxia o polímero MSAGM:VO reduziu a proliferação celular, em aproximadamente 20 % quando comparado com o controle (Nx). Estes resultados são compatíveis aos obtidos nos ensaios de viabilidade com MTT (FIGURA 22) e proliferação (FIGURA 23) com cristal violeta. Em condições de hipóxia (Hx) não foi observada diminuição significativa na proliferação celular em relação ao controle e em relação a condições de Nx.

Há diversos estudos com polissacarídeos e atividade antitumoral em condições de normóxia (YE *et al.*, 2008; ZONG *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017). No entanto, são escassos os estudos com polissacarídeos em condições de hipóxia. Ao contrário dos resultados do presente estudo, Onishi e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos de polissacarídeos ligados a proteínas (PSK) em células de adenocarcinoma de pâncreas (PCDAC) em condições de normóxia e hipóxia. PSK reduziu a proliferação celular em

condições de hipóxia. Em condições de normóxia, PSK não foi capaz de reduzir a proliferação dessas células.

Fucoidanas extraídas de algas marrons (*Undaria pinnatifida sporophylls*) que são polissacarídeos naturalmente sulfatados foram capazes de reduzir a proliferação de células tumorais de fígado de rato (Hca-F) em condições de hipóxia. Os autores atribuíram os efeitos antiproliferativos pela redução nos níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$ , assim como redução nos níveis de p-PI3K, p-Akt e p-ERK (TENG et al., 2015).

FIGURA 30 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS HepG2 APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A proliferação celular das células HepG2 foi monitorada pelo equipamento ADAM® em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx) na presença e ausência de MSAGM:VO. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*  $p < 0.0001$ , indica os valores significativamente diferentes em relação ao controle (células incubadas somente com o meio de cultura).

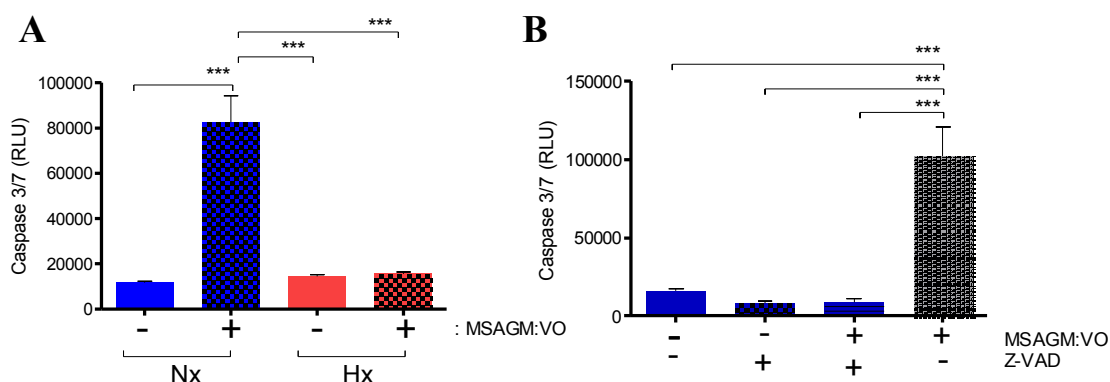
### 6.3.2 Atividade das caspases 3 e 7

O processo de morte celular por apoptose é caracterizado por uma série de eventos, incluindo alterações morfológicas, perda de aderência à matriz e de células vizinhas (presença de células soltas em cultura), condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (INDRAN *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2015). Muitas moléculas estão envolvidas no processo de apoptose, como as relacionadas ao controle das vias de ativação, dentre essas, destacam-se, as proteínas pro e anti-apoptóticas, bem como a ativação de caspases (BROWN, 2005).

Em condições de normóxia, MSAGM:VO promoveu o aumento da atividade dessas caspases, ao passo que, em condições de hipóxia esse efeito não foi observado (FIGURA 31 A). Para confirmar o efeito do complexo na atividade destas caspases, as células foram incubadas com MSAGM:VO na presença ou ausência do inibidor de apoptose, o *Z-VAD-*

*FMK*. Este composto se liga irreversivelmente ao sítio catalítico das caspases inibindo a atividade destas enzimas. Na figura 31 B observa-se que o inibidor quando incubado juntamente com o polissacarídeo MSAGM:VO inibiu a atividade das caspases 3 e 7 em condições de normóxia, sugerindo que a morte celular induzida por MSAGM:VO ocorre por apoptose.

FIGURA 31 - ATIVIDADE DAS CASPASES 3 E 7 DAS CÉLULAS HepG2 APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Atividade das Caspases 3/7 após 72 h de tratamento com MSAGM:VO, em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx); B) Atividade das caspases 3/7 com e sem o inibidor das enzimas (Z-Vad) somente em condições de normóxia. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*\* são os valores de  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

As células tumorais em condições de hipóxia desenvolvem várias habilidades que resultam na ativação de respostas celulares adaptativas que contribuem para a progressão do tumor. Já é bem estabelecido que tumores hipóxicos estejam associados com um mau prognóstico em diferentes tipos de câncer. Além disso, estes tumores estão relacionados à resistência a tratamentos como radioterapia, quimioterapia e terapia direcionada, contribuindo para uma baixa taxa de sobrevivência do paciente (BROWN; WILSON, 2004; WILSON; HAY, 2011).

Estudos (BELLOT *et al.*, 2009; CHICHE *et al.*, 2009; BRAHIMI-HORN *et al.*, 2012) indicam que células LS174T tratadas com STS expostas a 72 h de tratamento, apresentaram proteção contra aos estímulos apoptóticos. Entretanto, quando essas células eram expostas em condições de normóxia, as células eram levadas a morte celular por apoptose. Os autores sugeriram que os efeitos em condições de hipóxia poderiam estar relacionados com as mitocôndrias, através da fusão mitocondrial pelo direcionamento de BNIP3 e BNIP3L para as membranas mitocondriais, dando as células uma vantagem de crescimento. BNIP3 e BNIP3L

são proteínas consideradas de “pro sobrevivência” e estão associadas ao processo autofágico em condições de hipóxia.

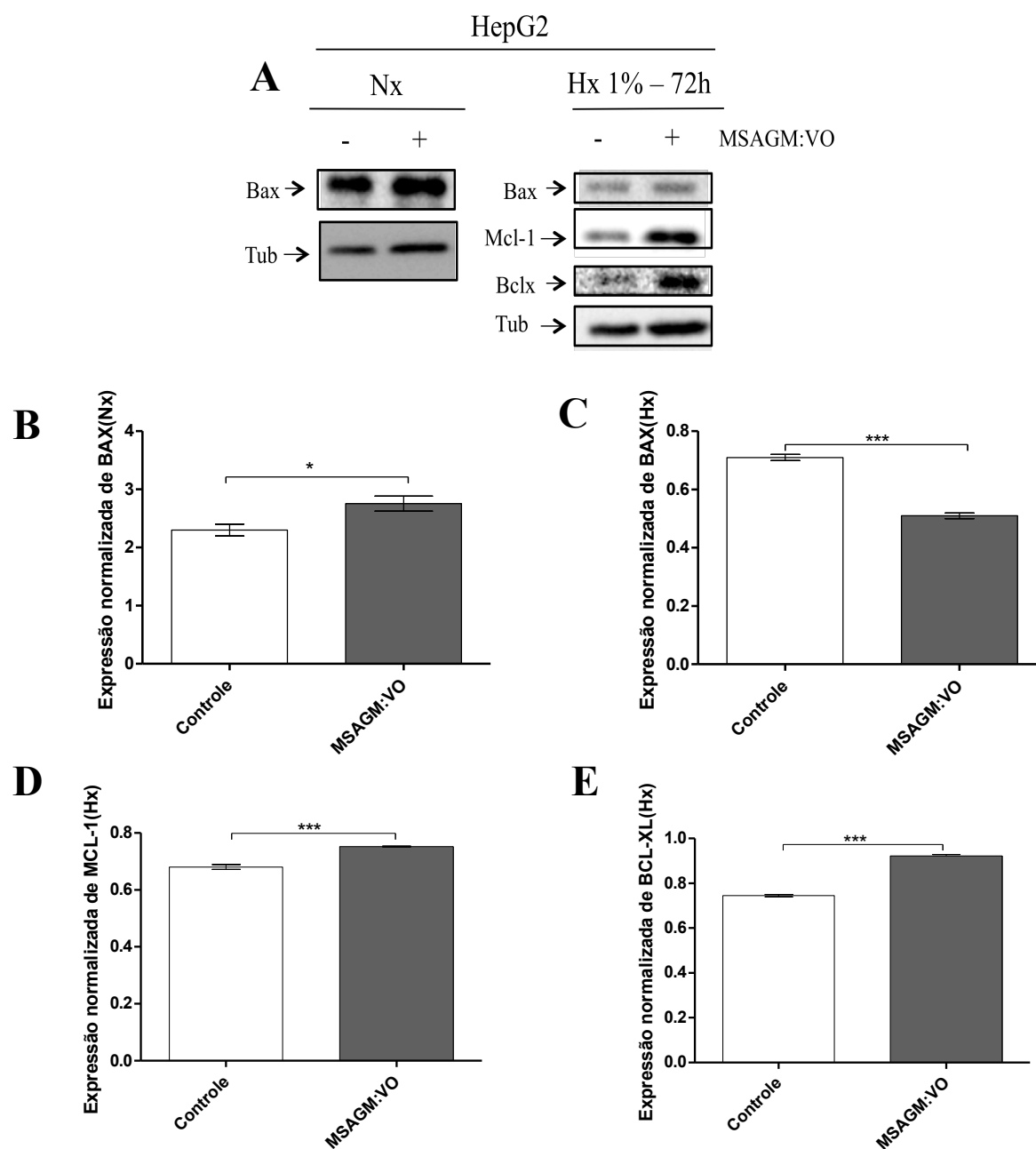
### 6.3.3 Expressão de proteínas pro e anti-apoptóticas

Outra forma de avaliar a morte celular por apoptose é o monitoramento dos níveis de expressão das proteínas da família BCL-2, as quais possuem um importante papel na regulação nesta via, como também de outras, como necrose e autofagia (BROWN, 2005; YIP; REED, 2008; HARDWICK; SOANE, 2013). As proteínas BAX e BAK (proteínas pro-apoptóticas), por exemplo, induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa causando a ativação das caspases e consequentemente ativando proteínas e outros mediadores de morte celular, enquanto que as proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 atuam como guardiãs da membrana externa da mitocôndria preservando sua integridade (BROWN, 2005; YIP; REED, 2008).

Como observado, em condições de hipóxia MSAGM:VO não afetou a proliferação celular e atividade das caspases 3 e 7, sugerindo uma possível resistência destas células à ação do biopolímero. Sendo assim, foram avaliadas proteínas anti e pro-apoptóticas da família BCL-2, pelo método do western blot. Nos resultados apresentados na figura 32, observa-se o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX em condições de normóxia, após o tratamento com MSAGM:VO, no entanto, isto não ocorreu em condições de hipóxia. Já em relação às proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e Bcl-xl, observa-se um aumento em condições de hipóxia, o que poderia justificar a resistência à indução de morte celular por MSAGM:VO (FIGURA 32).



FIGURA 32 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PRO E ANTI APOPTÓTICAS DE CÉLULAS HepG2 APÓS O TRATAMENTO COM MSAGM:VO



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Efeitos de MSAGM:VO nos níveis de expressão das proteínas Bax (pro-apoptóticas) e Mcl-1, Bcl-xL (anti-apoptóticas) envolvidas nos processos de apoptose em células HepG2 em condições de Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx) após 72 h de tratamento na concentração de 250 µg/mL. A tubulina foi utilizada como *loading control*. B) Normalização por tubulina da proteína BAX em condições de normóxia; C) Normalização por tubulina da proteína BAX em condições de hipóxia; D) Normalização por tubulina da proteína MCL-1 em condições de hipóxia e E) Normalização por tubulina da proteína BCL-XL em condições de hipóxia. Os valores representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. \* e \*\*\* são os valores de  $p < 0.05$  e  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

Uma possibilidade de comprovar se as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xl e Mcl-1) estariam relacionadas com mecanismos de resistência a morte celular ocasionada pelo polissacarídeo em condições de hipóxia, seria utilizar um inibidor dessas proteínas, embora não tenha sido realizado neste estudo. Neste sentido, Brahimi-Horn e colaboradores (2012), quando avaliaram os mecanismos citotóxicos da STS em células tumorais de adenocarcinoma de cólon (LS174T) em condições de normóxia e hipóxia, observaram que a STS promovia a morte celular em condições de normóxia, porém, não em condições de hipóxia. Sendo assim, os autores utilizaram um inibidor de Bcl-xl (ABT-737) em células LS174T tratadas com STS e expostas a condições de hipóxia. Os resultados obtidos por esses autores demonstraram que ABT-737 restaurou a apoptose das células tratadas com STS em células LS174T hipóxicas, sugerindo que o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas estaria associada à resistência a apoptose.

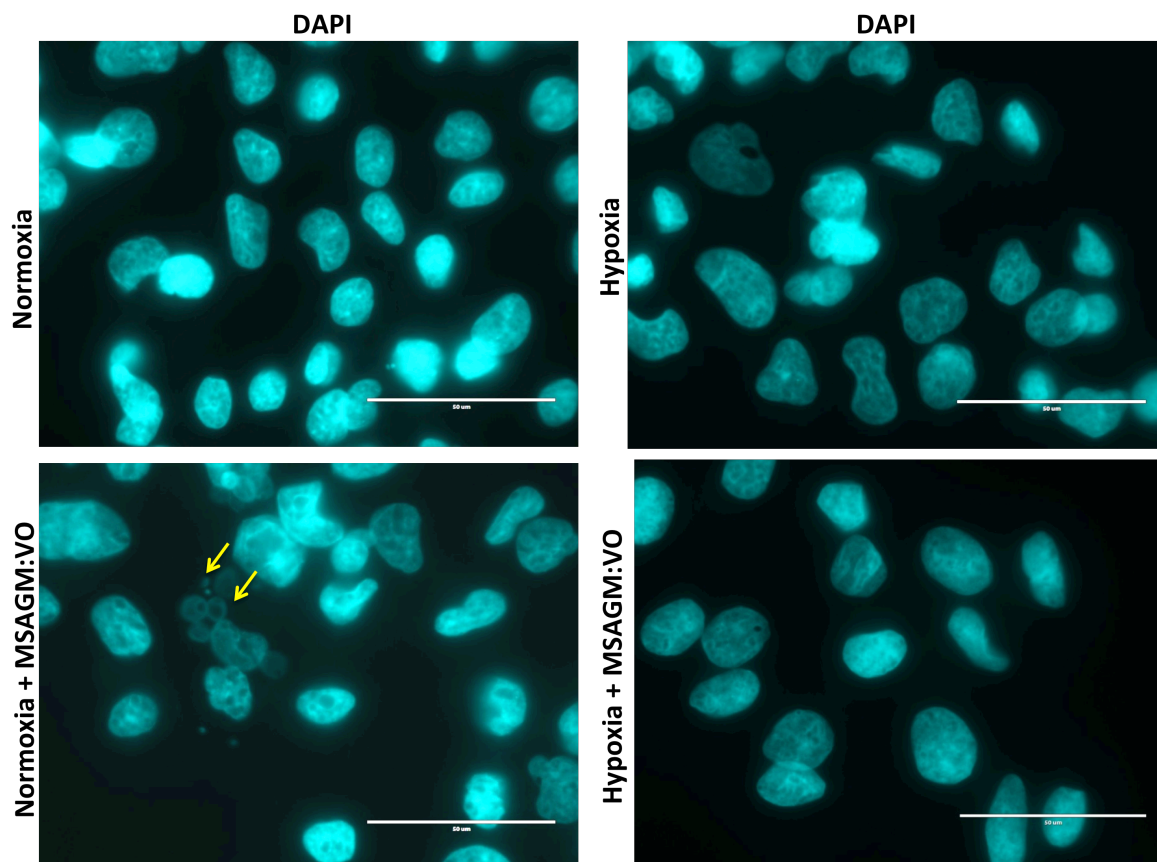
#### 6.3.4 Morfologia

Uma das formas de observar alterações morfológicas características de processo de apoptose seria a visualização das células em microscopia confocal, após a coloração do núcleo celular com DAPI (4, 6 – *diamidino* – 2 – *phenylindole*). As fotos obtidas nestas avaliações mostram que os núcleos das células HepG2 em condições de normóxia e tratadas com MSAGM:VO apresentaram vesículas (setas amarelas), ou seja, corpos apoptóticos. No entanto, o mesmo não foi observado para as células HepG2 incubadas em hipóxia, mesmo após a presença do polissacarídeo (FIGURA 33).

Ray e colaboradores (2006) utilizando a mesma metodologia verificaram que o composto de vanádio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) após 48 h de tratamento promoveu fragmentação do DNA e condensação da cromatina em células de câncer de mama (MCF7) em condições de normóxia.

Estudos com polissacarídeos isolados de *P. abalonus* também apresentaram efeitos antitumorais em células MCF-7. Os autores (SHI et al., 2013) observaram em condições de normóxia mudanças na morfologia dessas células pela coloração DAPI. Células não tratadas com os polissacarídeos apresentaram núcleos alargados e sem nenhuma condensação ou fragmentação, já as células tratadas com os biopolímeros, foi possível observar corpos apoptóticos, caracterizando a morte celular por apoptose. Os autores ainda observaram que os biopolímeros promoveram a redução no  $\Delta\Psi_m$ , aumento de ROS e proteínas pro-apoptóticas, assim como aumento na atividade das caspases 3 e 9. Os resultados são similares aos do presente estudo nas mesmas condições (normóxia).

FIGURA 33 – VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DO NÚCLEO DAS CÉLULAS HepG2 INCUBADAS COM MSAGM:VO APÓS COLORAÇÃO COM DAPI



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Microscopia confocal com coloração DAPI das células HepG2 após 72 h de tratamento com MSAGM:VO (250 µg/mL) em condições de normóxia e hipóxia. Os resultados são referentes a três experimentos realizados em duplicata.

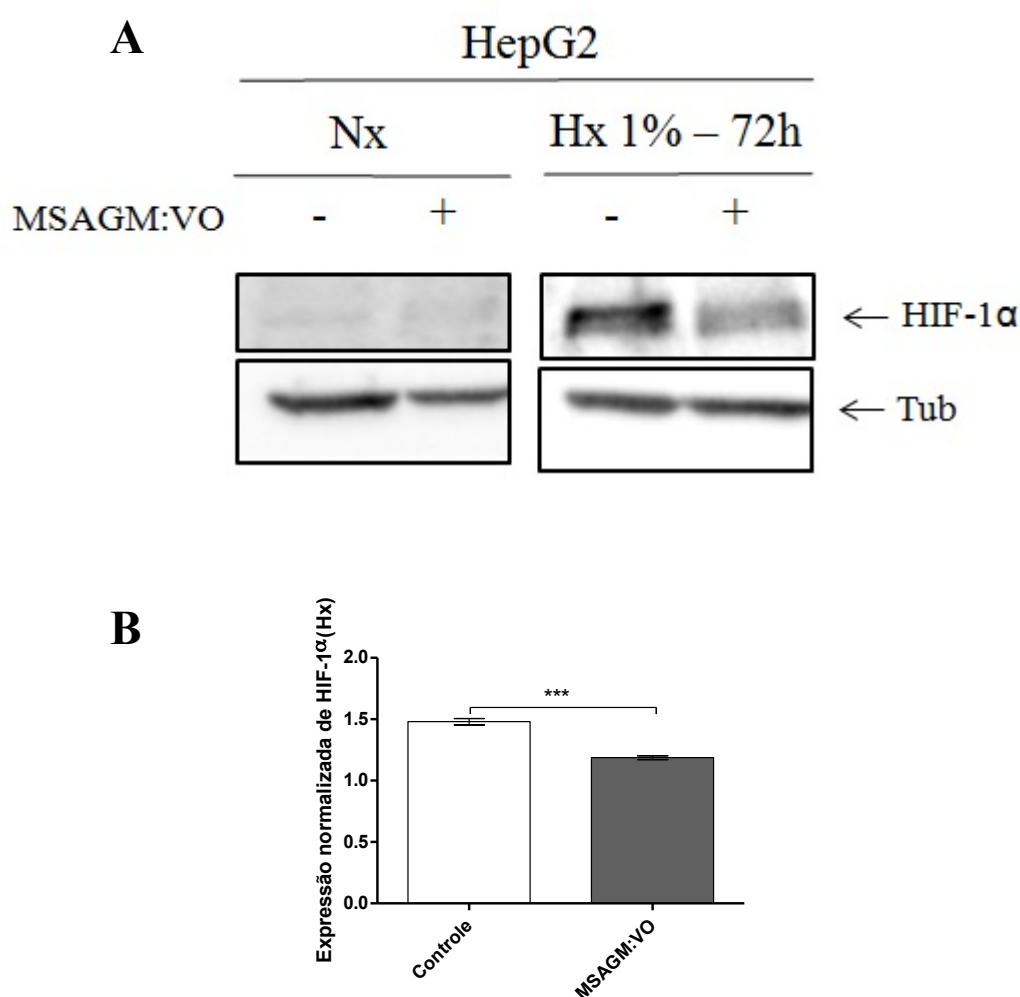
### 6.3.5 Possíveis mecanismos de resistência

Como mencionado, células expostas a hipóxia apresentam resistência a alguns quimioterápicos (CHICHE et al., 2009; BRAHIMI-HORN et al., 2012; WU et al., 2015). Os efeitos de proteção e/ou resistência a certos quimioterápicos podem ser relacionados com HIF-1 $\alpha$ . No entanto, a hipóxia pode promover resistência independentemente do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (BROWN; WILSON, 2004). Os níveis de expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  após 72 h de tratamento com MSAGM:VO foram reduzidos em 20% relação ao controle (FIGURA 34).

Onishi e colaboradores (2013) observaram redução dos níveis de HIF-1 $\alpha$  e redução na proliferação das células PDAC tratadas com PSK em condições de hipóxia. No presente estudo, embora tenha sido observado redução nos níveis de HIF-1 $\alpha$  não houve redução da proliferação das células HepG2.

Os mecanismos de resistência e/ou sobrevivência observados no presente estudo, podem ser independentes de HIF-1 $\alpha$ , ou seja, mesmo MSAGM:VO sendo capaz de diminuir a expressão ou afetar a estabilidade de HIF-1 $\alpha$ , isto não significa que as células HepG2 terão a capacidade de proliferação reduzida. Neste sentido, como os níveis de mRNA não foram avaliados, pode-se dizer que a estabilidade de HIF-1 $\alpha$  foi alterada e que MSAGM:VO pode funcionar como um regulador negativo de HIF-1  $\alpha$ .

FIGURA 34 – NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE HIF-1 $\alpha$  E TUBULINA APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

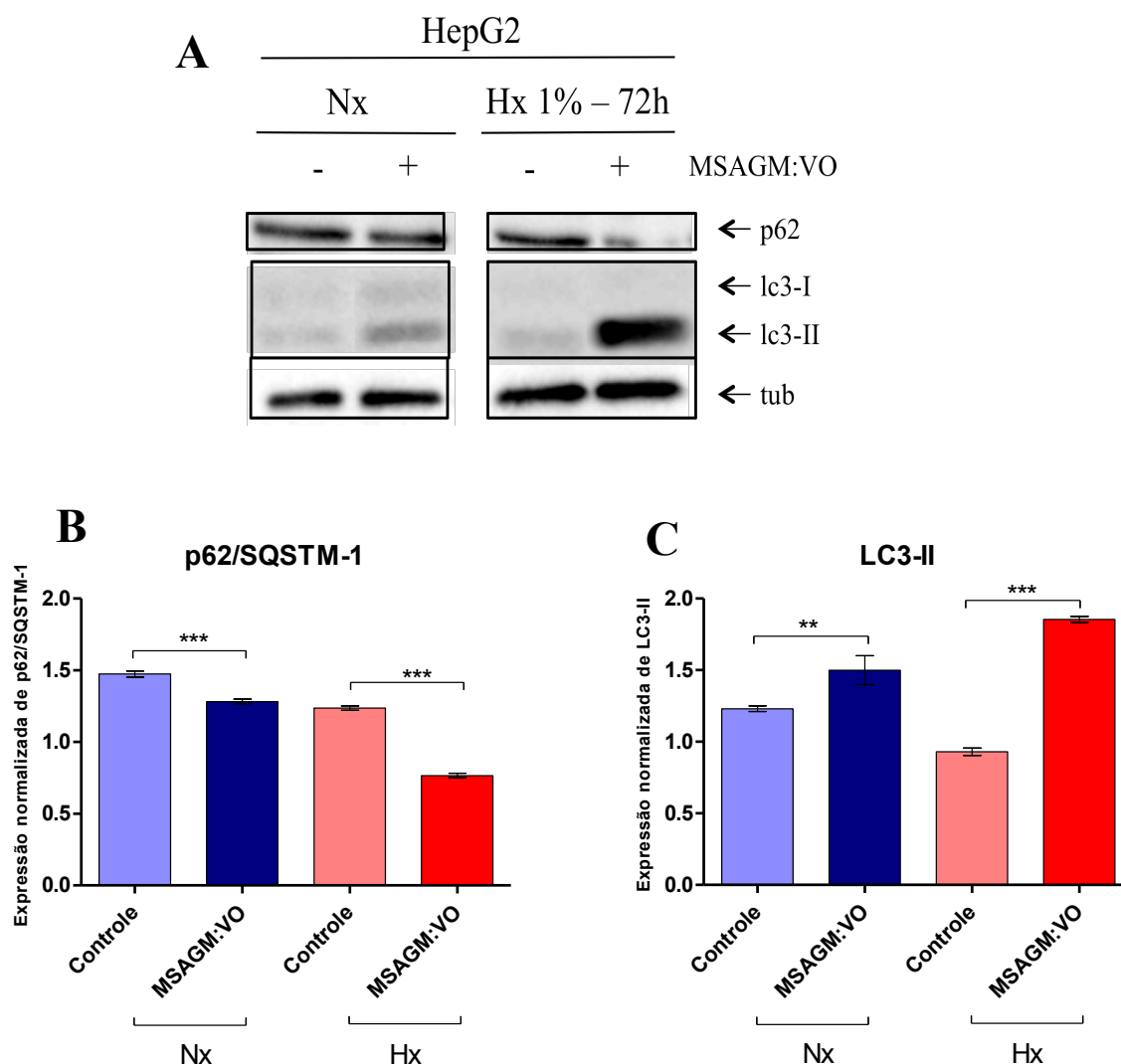
NOTA: A) Efeitos de MSAGM:VO nos níveis de expressão de HIF-1 $\alpha$  e TUBULINA das células HepG2 em condições de Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx) após 72 h de tratamento na concentração de 250  $\mu$ g/mL. A tubulina foi utilizada como *loading control*. B) Normalização por tubulina com HIF-1 $\alpha$  em condições de hipóxia. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.0001$  são os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

Sugere-se que a resistência a apoptose, frente a determinados quimioterápicos, em condições de hipóxia pode ser pela ativação da autofagia, que seria um mecanismo de

proteção nestas células (BELLOT *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2015). Quando a autofagia é ativada, a proteína LC3-I que está localizada no citoplasma é clivada, lipidada e inserida na membrana do autofagossomo como LC3-II. Neste sentido, o aumento da expressão de LC3-II é uma característica de células em processo autofágico que está relacionado com o aumento no número de autofagossomos (BELLOT *et al.*, 2013). Além de monitorar os níveis de LC3-II, alguns estudos indicam que avaliar os níveis de expressão de p62/SQSTM1 também pode ser utilizado para a detecção da autofagia. Sendo assim, a não expressão de p62/SQSTM1 indica que a proteína foi degradada no processo autofágico e se estes níveis aumentarem seria característico de inibição deste processo (BJØRKØY *et al.*, 2009).

Para verificar se o complexo MSAGM:VO promove a autofagia em condições de hipóxia, as células HepG2 foram incubadas com o biopolímero por 72 h e os níveis de expressão das proteínas LC3-II e p62/SQSTM1 foram analisados. Na figura 35 A observa-se que os níveis de expressão da proteína LC3-II foram aumentados em condições de hipóxia e, consequentemente, foi visualizada a degradação da proteína p62/SQSTM1. No entanto, em condições de normóxia a autofagia não foi tão pronunciada em relação as condições de hipóxia, uma vez que a degradação de p62/SQSTM-1 não foi observada. Essas diferenças na regulação do processo de autofagia por normóxia e hipóxia podem também ser um mecanismo de resistência ao tratamento com o polissacarídeo. Porém, é necessário fazer experimentos adicionais a fim de comprovar se a autofagia estaria realmente agindo como um mecanismo de defesa, para tanto é necessário utilizar inibidores da autofagia, como a cloroquina ou a bafilomicina ou até mesmo inibidores de proteínas anti-apoptóticas.

FIGURA 35 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE p62, LC3-I, LC3-II E TUBULINA APÓS TRATAMENTO COM MSAGM:VO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Efeitos de MSAGM:VO na expressão de proteínas envolvidas nos processo de autofagia em células HepG2 em condições de Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx) após tratamento de 72 h concentração de 250 µg/mL. A tubulina foi utilizada como *loading control*; B) Normalização por tubulina com p62/SQSTM-1 em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx); C) Normalização por tubulina com LC3-II em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx). Os valores representam a média ± o DP de três experimentos independentes. \*\* e \*\*\* são os valores de  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

No presente estudo, a expressão das proteínas anti-apoptóticas como Bcl-xL e Mcl-1, assim como os níveis elevados de LC3-II e a baixa expressão de p62 caracterizaram a inibição da apoptose, bem como a ativação da autofagia em condições de hipóxia após o tratamento com a galactomanana hidrolisada complexada com oxovanádio. Efeitos similares foram observados para quimioterápicos como a cisplatina em outras linhagens celulares (SUI et al., 2013; LEE et al., 2015; WU et al., 2015). Lee e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos de

cisplatina em células tumorais de pulmão (A549) em condições de hipóxia e normóxia. A cisplatina mostrou efeitos diferentes em ambas as condições. Em hipóxia, a autofagia foi ativada pela clivagem de LC3-I a LC3-II assim como foi observada a degradação de p62, caracterizando resistência das células tumorais ao tratamento com cisplatina. No entanto, ao inibir a autofagia pelo siRNA/LC3-II e incubar as células A549 com cisplatina em condições de hipóxia, o quimioterápico foi capaz de promover a apoptose nessas células.

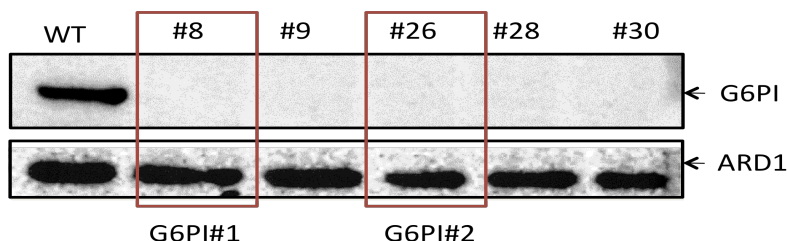
Em outro estudo realizado com as mesmas células tumorais de pulmão (A549 e SPC-A1) e cisplatina (WU et al., 2015), também demonstrou que a hipóxia protegeu significativamente as células A549 e SPC-A1 da morte celular induzida pela cisplatina pela ativação da autofagia de uma maneira dependente de HIF-1 $\alpha$ . Após a inibição da autofagia, pelo 3-MA (3-Metiladenina), a cisplatina foi capaz de promover a morte celular por apoptose, significando que a autofagia medeia à resistência à cisplatina em condições de hipóxia. Paralelamente, foi verificado que em condições de hipóxia ocorreu um aumento da autofagia induzida pela cisplatina, acompanhado por níveis de expressão baixos de proteínas pro-apoptóticas, o que se justificou pelo processo autofágico mais eficiente sob hipóxia. Neste sentido, esses autores sugeriram que a autofagia era um mecanismo de proteção após a incubação de cisplatina em condições de hipóxia.

#### 6.4 SILENCIAMENTO DA GLUCOSE – 6 – FOSFATO ISOMERASE (GPI) PELO SISTEMA CRISPR-CAS9 EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE CÓLON HUMANO (LS174T)

Os resultados que serão discutidos a partir daqui estão relacionados com a disfunção genética e/ou silenciamento da enzima GPI, responsável pela conversão da glucose – 6 – fosfato em frutose – 6 – fosfato. GPI é uma enzima citosólica que além de participar da via glicolítica participa na gliconeogênese. Além disso, nas células tumorais, GPI é considerada um Fator de Motilidade Autócrina (FMA) que estimula a mobilidade celular, migração e metástase que está associada com um mau prognóstico (TSUTSUMI *et al.*, 2003; AHMAD *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2016). O silenciamento foi realizado através do sistema CRISPR/cas 9. As células GFP positivas foram separadas por *sorting* e posteriormente adicionadas em placas de 60 mm e mantidas em meio DMEM à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Os clones foram selecionados e coletados um a um e submetidos a análises por western blot para comprovar a eficiência da transfecção (FIGURA 36). Foram coletados 32 clones dos quais 5 foram homozigotos. Após a confirmação da homozigose os clones foram re-clonados e apenas dois

foram selecionados para a realização dos experimentos. Os clones foram renomeados para GPIKO (FIGURA 36).

FIGURA 36 - ANÁLISE POR WESTERN BLOT DA CONFIRMAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA ENZIMA GPI EM CÉLULAS LS174T



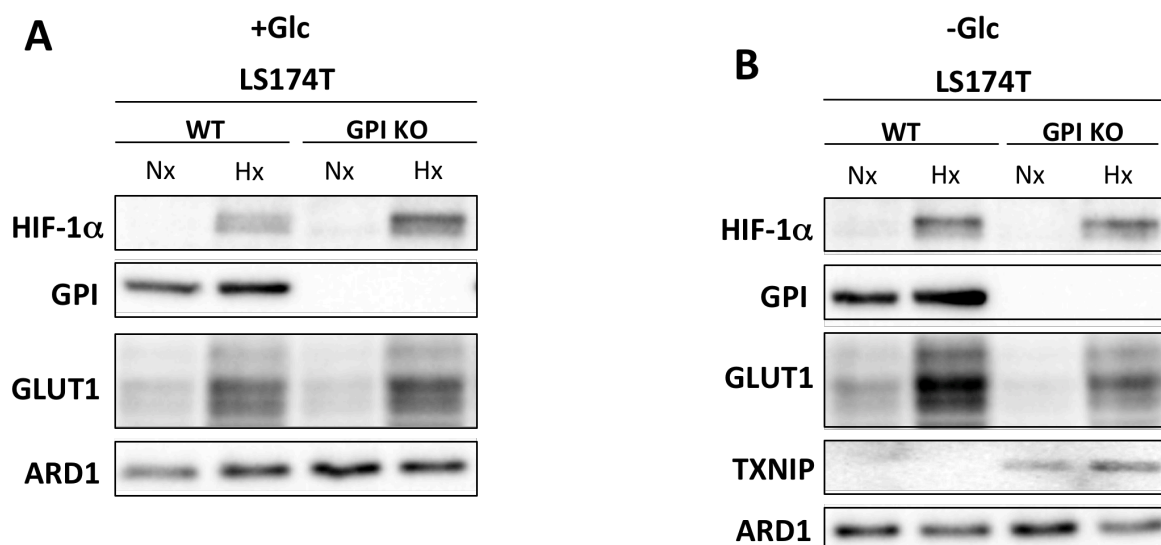
FONTE: O autor (2017).

NOTA: *Western Blot* das células LS174T WT e KO (#8 e #26) em condições de Normóxia (Nx) após 24 h. *ARD-1* foi utilizada como *loading control*.

A interrupção da via glicolítica pelo silenciamento da enzima GPI pode ter como consequência o acúmulo de glucose – 6 – fosfato. O fator de transcrição MondoA-Mlx é considerado um sensor nuclear importante, uma vez que é ativado com o aumento da concentração desse metabólito. Curiosamente, este fator induz a transcrição de outros genes como TXNIP, uma proteína que interage com a tioredoxina, o qual é considerado um potente regulador negativo da captação da glucose (STOLTZMAN *et al.*, 2011). Interessantemente, esta regulação realizada por TXNIP desencadeia um *feedback* que restringe a atividade do transportador GLUT-1 (POUYSSSEGUR *et al.*, 1980a; ULLREY *et al.*, 1982). De fato, foi observado que, nas condições de inanição da glucose por 24h, apenas a linhagem GPIKO expressaram TXNIP nas condições de normóxia e hipóxia (FIGURA 37) e como consequência houve uma diminuição da expressão de GLUT-1.



FIGURA 37 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1 E TXNIP EM CÉLULAS LS174T NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLUCOSE



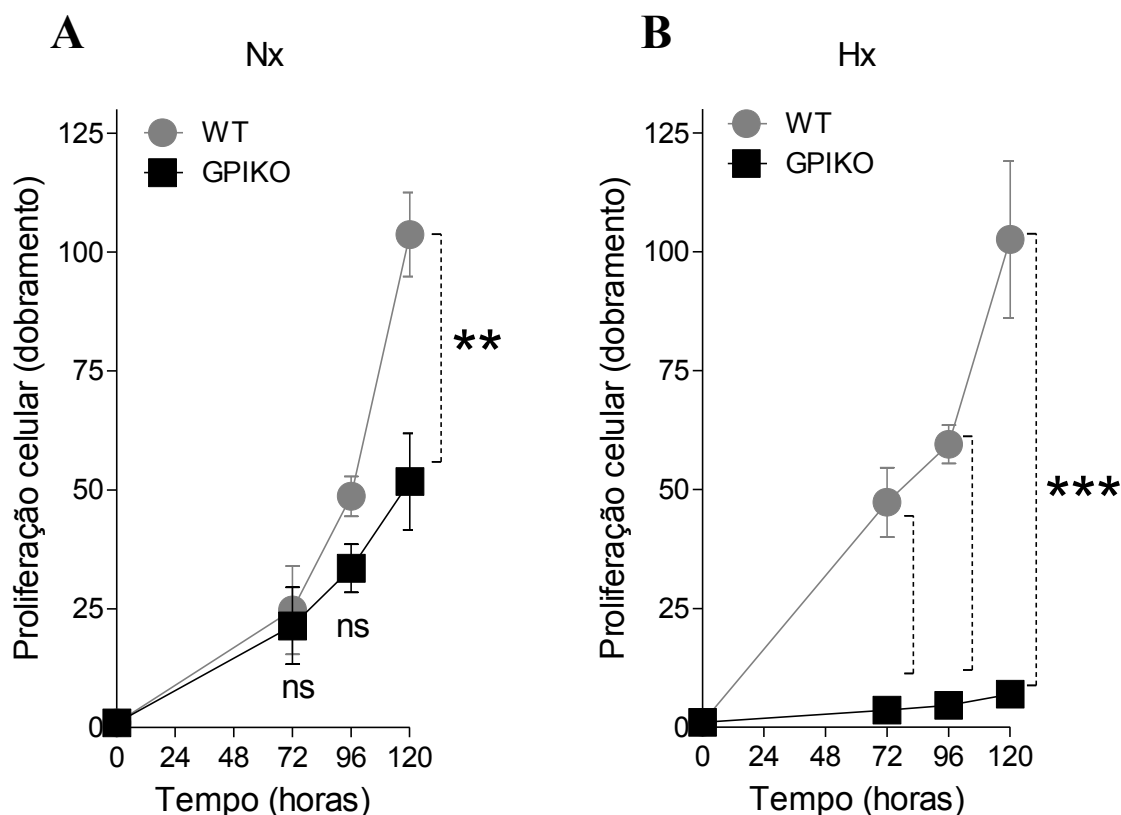
FONTE: O autor (2017).

NOTA: *Western Blot* das células LS174T WT e GPIKO em condições de Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx) após 24 h. A) Células cultivadas em meio de cultura DMEM na presença de glucose (25mM); B) Células cultivadas em meio DMEM na ausência de glucose. ARD-1 foi utilizada como *loading control*.

#### 6.4.1 Proliferação das células LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia e hipóxia

Em seguida, foi verificado se o silenciamento da enzima GPI estaria interferindo na proliferação e viabilidade dessas células, tanto em normóxia quanto em hipóxia. A proliferação celular foi avaliada no equipamento ADAM e pelo método clonogênico. As análises do clone GPIKO em normóxia evidenciaram a redução na proliferação, com diferença significativa de ~25% a partir de 96 h em relação a WT (FIGURA 38 A). No entanto, em condições de hipóxia, GPIKO, apresentou redução significativa (~90%) a partir de 72 h em relação ao controle (WT) (FIGURA 38 B).

FIGURA 38 – PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



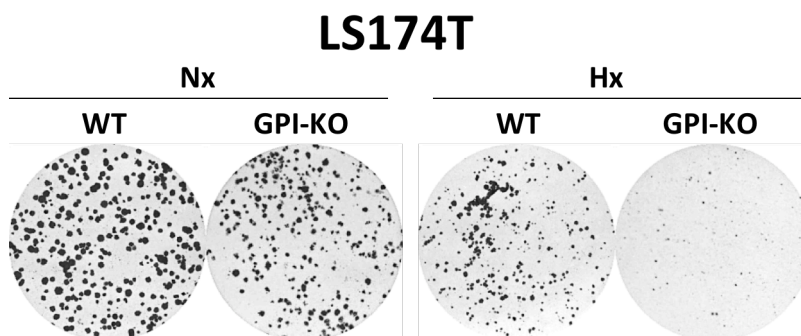
FONTE: O autor (2017).

NOTA: Avaliação da proliferação celular (dobramento) de LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) em meio contendo 25 mM de Glucose. A proliferação celular foi monitorada após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*\* e \*\*\* são os valores de  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

Em relação à capacidade de uma única célula em formar colônias, o clone GPIKO em ambas as condições de (normóxia e hipóxia), não teve a capacidade da formação quando comparado com as células WT (FIGURA 39 A e B). No entanto seu efeito foi mais pronunciado em condições de hipóxia, reforçando ainda mais que nessas condições, uma vez que não há a capacidade de respiração celular, devido a condições baixas de oxigênio.

Outro parâmetro avaliado foi a viabilidade celular que foi determinada através da coloração de iodeto de propídeo (PI), o qual se intercala no DNA de células não viáveis. Em ambas as condições (normóxia e hipóxia), não houve diferença significativa do clone GPIKO em relação às células WT (FIGURA 40).

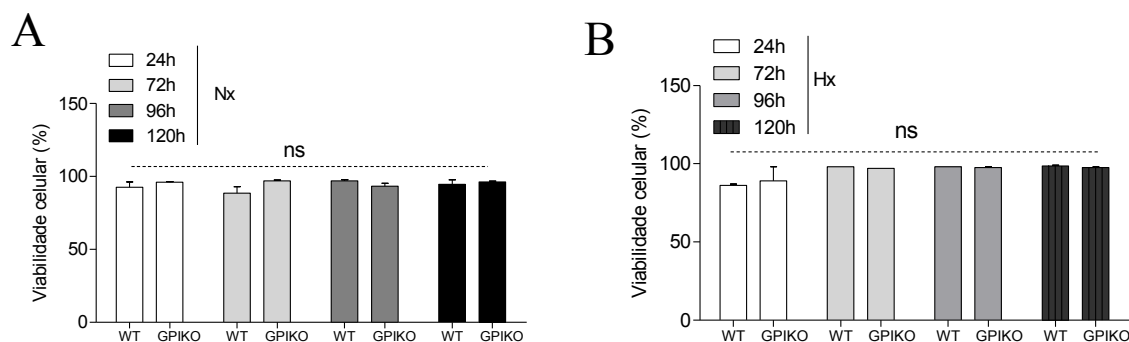
FIGURA 39 – ENSAIO REPRESENTATIVO CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: O ensaio clonogênico foi realizado após 10 dias em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx) e após esse período as células foram coradas com corante giemsa, foram realizados três experimentos em duplicata. As fotos foram tiradas de um único experimento.

FIGURA 40 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

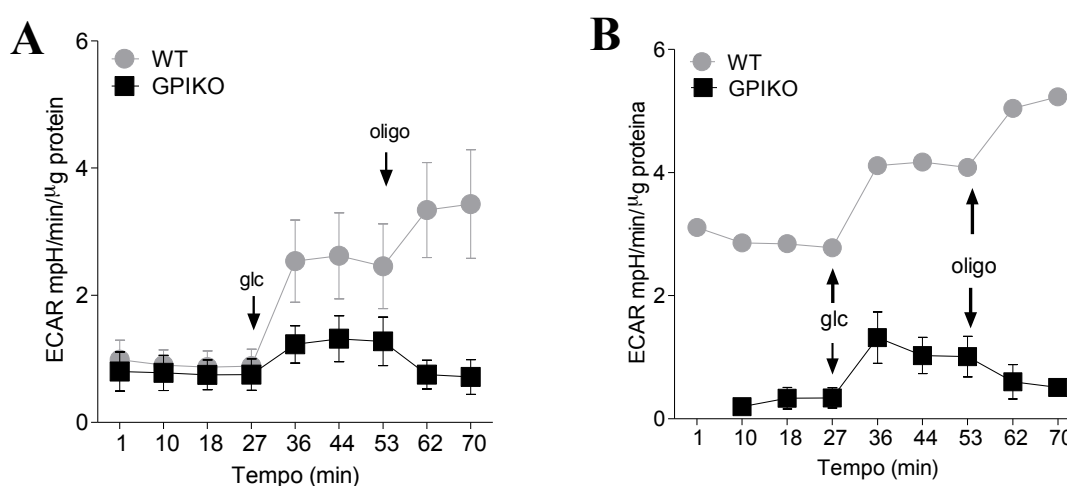
NOTA: Avaliação da viabilidade celular de LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) em meio contendo 25 mM de Glucose. A viabilidade celular foi monitorada após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h. O experimento foi realizado três vezes em duplicata. *ns* indica que os dados não foram significativos em relação ao controle do experimento.

#### 6.4.2 Avaliação do metabolismo das células LS174T WT e GPIKO em condições de normóxia e hipóxia

A fim de verificar se alguns parâmetros relacionados ao metabolismo das células GPIKO estariam alterados em relação à WT, inicialmente foi avaliado o ECAR (*Extracellular Acidification Rate*). A avaliação do pH extracelular indica se as células estão produzindo ou não ácido lático, produto final da via glicolítica, gerando um pH ácido no meio de cultivo. A ECAR e a taxa do consumo de oxigênio (OCR) foram monitoradas pelo equipamento *Seahorse XF24 analyzer* (*Seahorse Bioscience*). Após 24 h de incubação em ambas as condições (Nx e Hx) foram realizadas as análises. Em normóxia as células WT apresentaram

uma maior taxa de acidificação em relação ao clone GPIKO, logo depois da adição de glucose no meio (FIGURA 41). Este resultado foi mantido na presença de oligomicina, ou seja, as células GPIKO não responderam como as células WT, nas quais a via glicolítica estava mais ativa. Em condições de hipóxia, o clone GPIKO, logo no estado basal, apresentou uma redução da acidificação extracelular quando este foi comparado com WT, confirmando que o clone GPIKO apresenta uma deficiência da via glicolítica (FIGURA 41). Visto que o lactato é um produto final da via glicolítica anaeróbia, foi determinada sua concentração no meio extracelular. As células WT apresentaram uma quantidade maior de lactato quando comparado com o clone GPIKO em condições de normóxia e hipóxia após 24 h e 48 h, confirmando os resultados da taxa de acidificação extracelular (FIGURA 42).

FIGURA 41 – MONITORAMENTO DA TAXA DE ACIDIFICAÇÃO EXTRACELULAR (ECAR) DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA

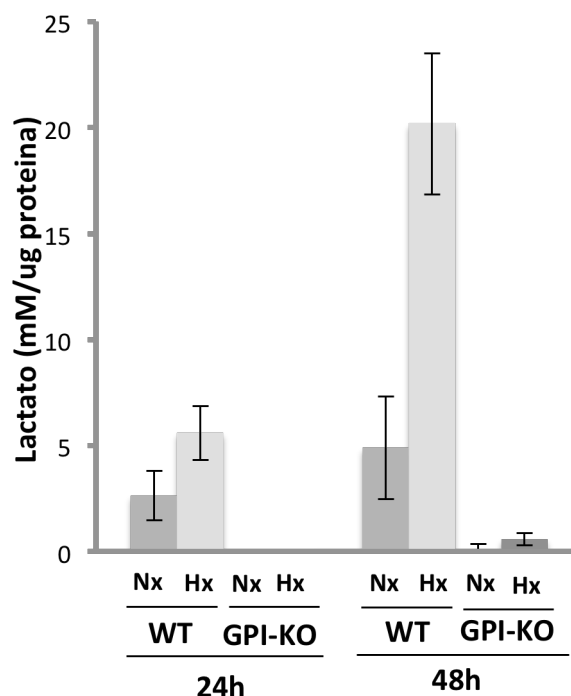


FONTE: O autor (2017).

NOTA: A avaliação do perfil metabólico das células LS174 WT e GPIKO foi monitorada no equipamento *Seahorse*. A taxa de acidificação extracelular (ECAR) foi determinada em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) após 24 h. Glc: glucose e oligo: oligomicina. Os experimentos foram realizados por quatro vezes em quadruplicata.

Os resultados referentes à taxa de acidificação extracelular indicaram que as células GPIKO não apresentam a via glicolítica ativada. Como demonstrado pelos ensaios em relação à proliferação celular em condições de normóxia e hipóxia que há ainda células vivas, não se descarta a hipótese de que a disfunção genética em GPI além da fosforilação oxidativa pode utilizar a via das pentoses fosfato como forma de sobrevivência. Embora em outra linhagem celular, Pouysségur e colaboradores (1980b), avaliaram fibroblastos de camundongos deficientes na enzima GPI. Os autores tiveram como resultados, níveis baixos de lactato extracelular assim como diminuição na captação da glucose.

FIGURA 42 - MONITORAMENTO DOS NÍVEIS DE LACTATO EXTRACELULAR DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA

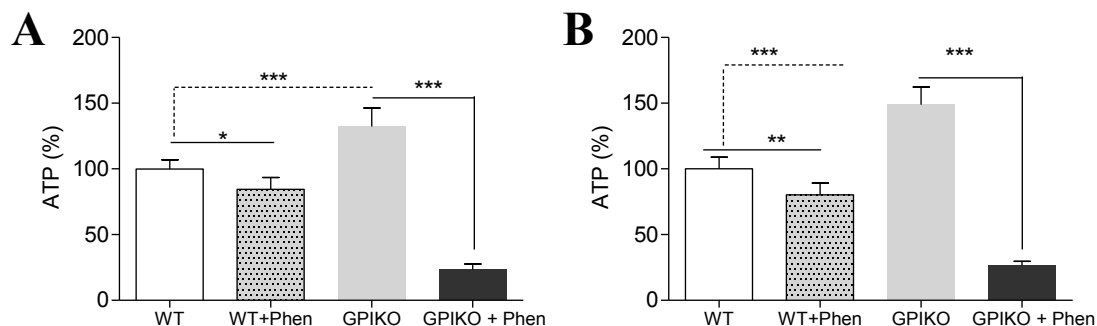


FONTE: o autor (2017).

NOTA: A quantificação do lactato extracelular, após 24 h e 48 h em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx), foi monitorada pelo equipamento *Cobass c701 instrument* (Roche) como descrito no item 5.7.7 da seção de material e métodos.

A redução da atividade da via glicolítica (ECAR) observada pelo clone GPIKO (normóxia e hipóxia), infere de que este esteja desviando o seu metabolismo para a fosforilação oxidativa. Sendo assim, as células foram incubadas por um período de ~6 h com a fenformina (50  $\mu$ M) em condições de normóxia e hipóxia, e em seguida foi realizada a avaliação dos níveis de ATP. A fenformina, é uma droga anti-diabética e uns dos seus principais efeitos é bloquear o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, consequentemente, aumentando os níveis de ácido láctico. Os níveis de ATP foram monitorados após 6 h na presença e ausência da fenformina. O clone GPIKO apresentou uma redução drástica dos níveis de ATP após a adição da droga em ambas as condições avaliadas (normóxia e hipóxia), em ~80% quando comparados com o controle (células não tratadas) (FIGURA 43).

FIGURA 43 - NÍVEIS DE ATP DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE FENFORMINA (Phen)

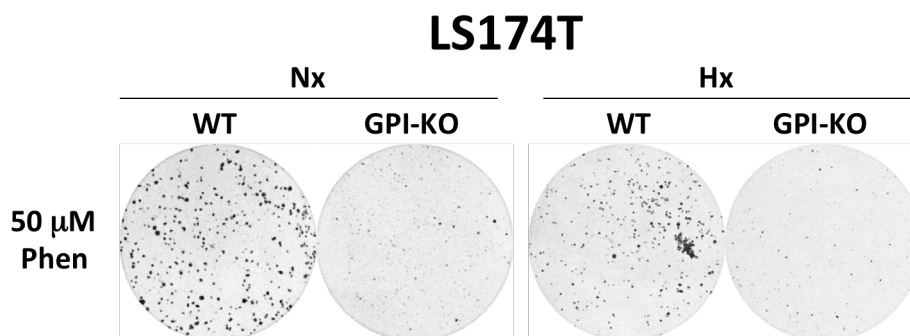


FONTE: O autor (2017).

NOTA: A quantificação de ATP em % foi realizada após 6 h em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) na presença e/ou ausência de fenformina (Phe) na concentração de 50  $\mu$ M. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*, \*\* e \*\*\* são os valores de  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

O efeito da fenformina também foi avaliado em relação ao potencial clonogênico das células GPIKO e WT (FIGURA 44). Após 10 dias de incubação com a fenformina em condições de normóxia, em ambas as linhagens, não ocorreu a formação de colônias, porém, esse efeito foi mais pronunciado nas células GPIKO. A interferência da fenformina na viabilidade das células GPIKO também foi avaliada (FIGURA 45). Em condições de normóxia, a fenformina reduziu em ~80% a viabilidade das células GPIKO após o período de 72 h em comparação a células não tratadas com a fenformina. Efeito similar foi observado em maiores tempos de tratamento, de 96 e 120 h, com redução 60 e 80% na viabilidade das células GPIKO, respectivamente.

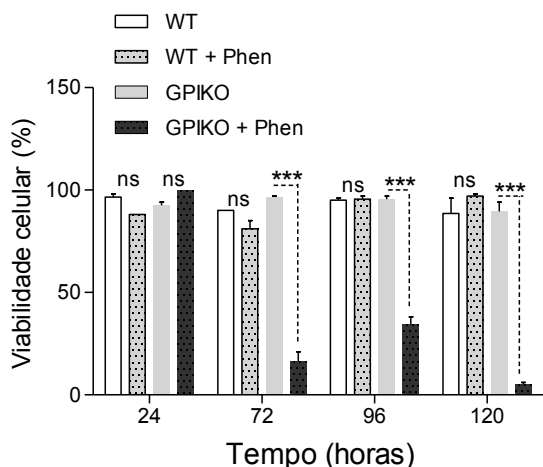
FIGURA 44 - ENSAIO CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA NA PRESENÇA E/OU AUSÊNCIA DE FENFORMINA (Phen)



FONTE: O autor (2017).

NOTA: As células LS174T WT e GPIKO foram plaqueadas em placas de 60 mm e após a aderência de 24 h foram tratadas com a fenformina (Phen). O ensaio clonogênico foi realizado após 10 dias em condições de normóxia (Nx) e hipóxia (Hx) e após esse período as células foram coradas com corante giemsa.

FIGURA 45 – EFEITO DA FENFORMINA (Phen) NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

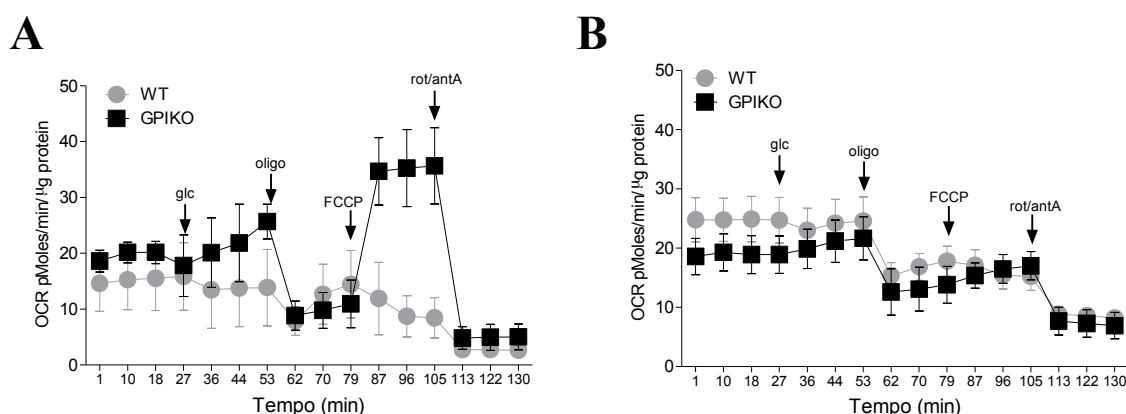
NOTA: A viabilidade celular na presença e ausência de fenformina (50 $\mu$ M) foi monitorada pelo intercalante de DNA o PI. A análise da viabilidade foi monitorada após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h em condições de normóxia. Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ , indicando os valores significativamente diferentes em relação ao controle de cada experimento.

Os resultados referentes à presença de fenformina estão de acordo com aqueles encontrados por Marchiq e colaboradores (2014). Os autores avaliaram os efeitos do silenciamento dos transportadores MCT em células LS174T. E assim como no presente estudo, o silenciamento de MCT, proporcionou as células o desvio do metabolismo glicolítico para a fosforilação oxidativa, devido ao acúmulo de lactato intracelular. Após a incubação com a fenformina em condições de normóxia e hipóxia, os autores observaram redução na viabilidade dessas células caracterizada pela queda dos níveis de ATP em ambas às condições indicando que ocorreu a morte celular. Neste mesmo estudo avaliou-se em modelos xenográficos a capacidade da mutação do MCT, na presença de fenformina, a qual inibiu o crescimento tumoral quando comparado com o tipo selvagem.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que células deficientes na enzima glucose – 6 – fosfato isomerase apresentam uma disfunção da glicólise, direcionam o metabolismo celular para a fosforilação oxidativa. Sendo assim, realizou-se a análise da taxa de consumo de oxigênio (OCR) após 24 h de incubação em condições de normóxia e hipóxia (FIGURA 46). Em normóxia, as células GPIKO apresentaram um aumento na capacidade respiratória quando comparada com as células WT. Como indicado na figura 46 A, após a adição da glucose no equipamento, as células GPIKO tiveram sua capacidade respiratória aumentada, seguida pela adição de oligomicina que reduziu a respiração dessas células e FCCP, ocorrendo um aumento na respiração pelo desacoplamento das mitocôndrias.

No entanto, quando essas células (GPIKO) são cultivadas em ambiente de hipóxia, e no mesmo tempo de incubação, a capacidade respiratória dessas células foi similar a das células WT (FIGURA 46 B). Esses dados comprovam que as células GPIKO utilizam a fosforilação oxidativa como forma de sobrevivência em condições de normóxia, porém em condições de hipóxia, como o oxigênio não está disponível, as células GPIKO podem sofrer alguma interferência no metabolismo.

FIGURA 46 - MONITORAMENTO DA CAPACIDADE RESPIRATÓRIA (OCR) DAS CÉLULAS LS174T WT E GPIKO EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A avaliação do perfil metabólico das células LS174 WT e GPIKO foi monitorada no equipamento *Seahorse*. A capacidade respiratória (OCR) foi determinada em condições de normóxia (A) e hipóxia (B) após 24 h. Glc: glucose; oligo: oligomycin, inibidor da porção  $F_0F_1$  da ATP sintase; FCCP: desacoplador; rot/antA: rotenona e antimicina A, inibidores dos complexos I e III, respectivamente.

#### 6.4.3 Avaliação do silenciamento da enzima GPI em camundongos nude

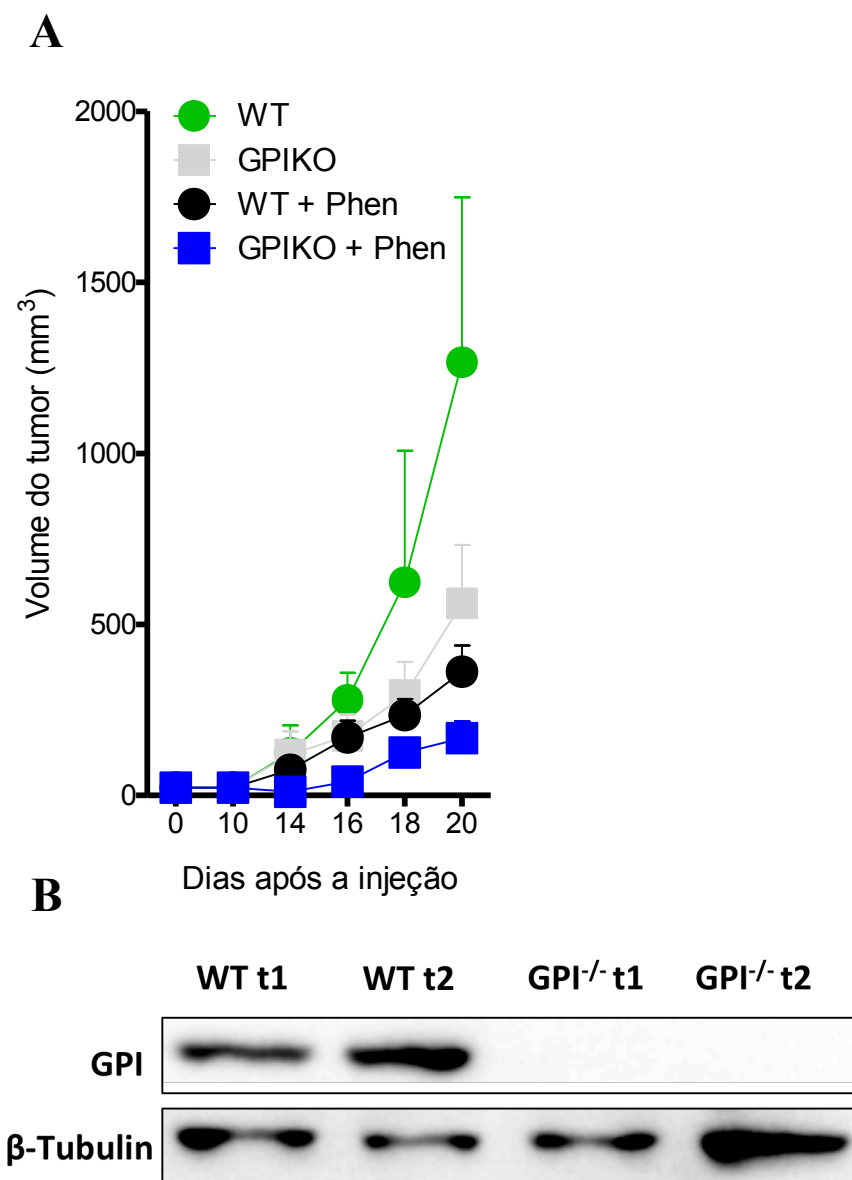
Dando sequência ao entendimento dos efeitos do silenciamento da enzima GPI, foram realizados experimentos *in vivo* em camundongos *nude* tratados com e sem fenformina. Todos os procedimentos para estes experimentos foram autorizados pelo Comitê de ética e Instituto de Cuidado Animal da Universidade de Nice – Sophia Antipolis. As células WT e GPIKO foram injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos machos de ~8 semanas de idade. Após a visualização do tumor, os camundongos receberam 200 mg/kg/dia de fenformina na água para beber com 5% de sacarose.

Comparando as duas linhagens WT e GPIKO sem o tratamento com a fenformina, o grupo de camundongos que foi inoculado com o clone não apresentou um aumento no volume tumoral a partir do 16º dia (os camundongos foram eutanasiados no 20º dia) (FIGURA 47 A). Em contrapartida e consistente com os resultados obtidos com os experimentos *in vitro* com a



fenformina, tanto na capacidade na formação de colônias quanto para proliferação, a fenformina sozinha reduziu o crescimento tumoral das células GPIKO quando comparadas com a linhagem WT, porém não de forma significativa. Ainda nesse contexto, foi realizada a análise dos tumores por western blot depois da realização da eutanásia indicando que não há expressão da enzima GPI na linhagem GPIKO (FIGURA 47 B).

FIGURA 47 – INIBIÇÃO DA ENZIMA GPI COMBINADA COM A PRESENÇA DE FENFORMINA EM MODELOS XENOGRÁFICOS



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A) Ensaio *in vivo* com camundongos *nude* inoculados subcutaneamente com as células LS174T WT e GPI#1. Os camundongos foram separados em 4 grupos (n=10). Cada grupo bebia água com 5% de sacarose na presença e/ou ausência de fenformina (200 mg/Kg/dia) a qual foi adicionada na água antes e após a injeção com os tumores. Os resultados são expressos como média e  $\pm$ DP de 3 experimentos realizados. B) Western blot dos tumores após o 20º dia de inoculação. Tubulina foi utilizada como *loading control*.

## 7. DISCUSSÃO FINAL

É de amplo conhecimento que a atividade biológica de polissacarídeos está diretamente relacionada com as características estruturais de cada polímero (LIU *et al.*, 2015a). A fim de potencializar ou obter novos efeitos para essas biomoléculas, diferentes tipos de modificações químicas de polissacarídeos incluindo a complexação com metais objetivando aplicação farmacológica tem sido utilizada (BARAN, 2009; LIAO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). Em relação ao modelo celular utilizado neste estudo (células HepG2), destaca-se a existência de receptores ASGP-R, que reconhecem unidades de manose e galactose em um dado composto (LEPENIES *et al.*, 2013), neste caso as galactomananas. Estes receptores têm sido alvo de estudos para ligantes carreando compostos visando aplicação antitumoral (OHYA *et al.*, 2001).

Baseado nestas informações e o grande potencial de aplicação das galactomananas (ADRIAZOLA *et al.*, 2014; MOURA NETO *et al.*, 2014) neste estudo foi avaliado os efeitos de diferentes preparações de galactomananas isoladas de sementes de *S. amazonicum* em células HepG2. Os resultados obtidos em relação à atividade citotóxica destas preparações foram distintos em algumas avaliações e permitem sugerir diferentes mecanismos para a ação citotóxica dos biopolímeros não complexados e complexados com o oxovanádio. Entre as diferenças mais significativas foi a não relação de efeitos exibidos entre uma preparação e sua respectiva forma complexada com o metal. SAGM e MSAGM:VO foram os biopolímeros considerados mais citotóxicos para as células HepG2 do que SAGM:VO e MSAGM. Considerando a especificidade química entre ligantes e receptores para desencadear alterações celulares e/ou moleculares, os efeitos observados para SAGM e MSAGM:VO possibilitam sugerir algumas hipóteses para os mecanismos citotóxicos destes biopolímeros nas células HepG2.

As alterações observadas no metabolismo das células HepG2 tratadas com SAGM, podem estar relacionadas com os receptores ASGP-R. SAGM pode ser reconhecida pelo receptor, e pelo processo de endocitose desencadear os efeitos citotóxicos (FIGURA 48). Por outro lado, SAGM também pode permear as membranas celulares e consequentemente gerar tais efeitos. Nos estudos prévios realizados por Cunha – de Padua e colaboradores (2017) foi demonstrado que SAGM inibiu a respiração e aumentou os níveis de lactato nas células HepG2. Estes resultados foram confirmados no presente estudo e adicionalmente não foi observado aumento de ROS e diminuição do  $\Delta\Psi_m$ , indicando que o mecanismo citotóxico desencadeado por SAGM não envolve ROS e alteração do  $\Delta\Psi_m$ . Estes efeitos podem estar

relacionados a um possível mecanismo de sobrevivência, no qual a galactomanana seria capaz de desviar o metabolismo celular para a via glicolítica. O aumento do metabolismo glicolítico poderia favorecer a via das pentoses fosfato, culminando no aumento de NADPH que consequentemente gera um aumento de GSH, impedindo a formação de ROS nas células HepG2 (RIGANTI *et al.*, 2012). Ainda assim não se descarta a possibilidade da galactomanana SAGM induzir a autofagia nas células HepG2, como um mecanismo de morte ou sobrevivência, uma vez que, quando existe danos ou mau funcionamento nas mitocôndrias a autofagia é responsável em remover organelas danificadas, neste caso as mitocôndrias (AZAD *et al.*, 2009; BELLOT *et al.*, 2013).

A galactomanana parcialmente hidrolisada e complexada com oxovanádio (MSAGM:VO) também inibiu a respiração celular e adicionalmente aumentou os níveis de ROS, além de reduzir o  $\Delta\Psi_m$  (FIGURA 48). MSAGM:VO também seria capaz de interferir no metabolismo das células HepG2, ao diminuir os níveis de lactato e respiração dessas células, não promovendo um direcionamento para via glicolítica ou fosforilação oxidativa. Além disso, não se descarta a possibilidade de MSAGM:VO induzir a morte celular por apoptose, uma vez que o complexo promoveu o aumento da atividade das caspases 3 e 7 e da proteína pró-apoptótica, BAX, em condições de normóxia. Em conjunto, esses resultados sugerem que o mecanismo de ação de MSAGM:VO envolve a via intrínseca da apoptose. No entanto, vale ressaltar que isto se aplica a condições de normóxia (20 % de oxigênio e 5 % de CO<sub>2</sub>), o que não ocorreu em hipóxia (1% de oxigênio e 5% de CO<sub>2</sub>).

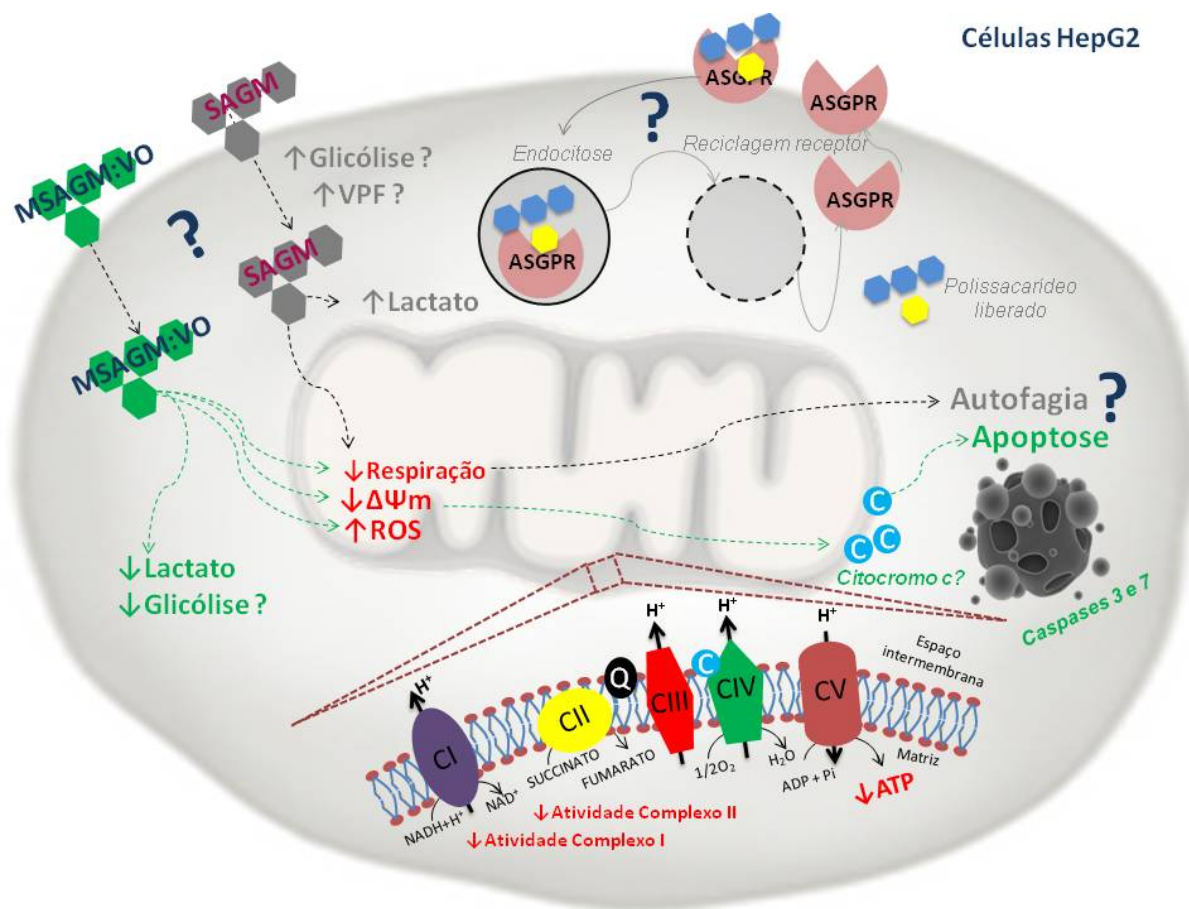
Quando se trata de MSAGM:VO deve-se destacar também a importância da presença do vanádio, uma vez que compostos contendo vanádio já demonstraram efeitos em células HepG2 como, parada no ciclo celular, aumento de ROS, redução do  $\Delta\Psi_m$  e morte celular por apoptose, pela ativação da cascata de caspases (WANG *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010; STRIANESE *et al.*, 2013). Estudo com preparações de galactomananas nativas e hidrolisadas e complexadas com oxovanádio foram citotóxicas para células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009). Embora o mecanismo de morte não tenha sido investigado, o estudo mostra que as preparações com o vanádio foram significativamente mais citotóxicas que as formas não complexadas. Outros estudos com galactomananas e outras classes de polissacarídeos complexadas com este metal, confirmam que possivelmente o vanádio contribua para atividade leishmanicida e efeitos moduladores da resposta biológica (NOLETO *et al.*, 2009; AMARAL *et al.*, 2015).

Um dos desafios na pesquisa anticâncer é descobrir compostos capazes de levar a morte de células tumorais não havendo efeitos danosos a células normais. Para isto, deve-se

visar um fenótipo único para as células tumorais, como por exemplo, a hipóxia que é considerada uma característica principal dos tumores, uma vez que os tumores de crescimento acelerado se tornam rapidamente distantes dos vasos sanguíneos que transportam oxigênio. Além disso, esta característica específica do câncer diminui a sobrevida dos pacientes. Neste sentido, a busca por compostos antitumorais que alteram o metabolismo das células tumorais, principalmente em condições de hipóxia, tem sido realizada.

Apesar de alguns polissacarídeos apresentarem inibição no crescimento de células tumorais em hipóxia, pela redução dos níveis de expressão de HIF-1 com a concomitante redução na proliferação das células tumorais (ONISHI *et al.*, 2013; TENG *et al.*, 2015), quando as células HepG2 foram tratadas com o biopolímero MSAGM:VO em condições de hipóxia, o composto não apresentou o resultado esperado, como o observado em condições de normóxia. Um dos possíveis mecanismos de resistência e/ou sobrevivência desenvolvido pelas células HepG2 após o tratamento com MSAGM:VO pode estar relacionado com a capacidade das células em induzir a autofagia, através da reciclagem de componentes essenciais para manter as células vivas. Também não se descarta a possibilidade de que MSAGM:VO não seja capaz de modular o metabolismo mitocondrial em condições de hipóxia, uma vez que este já está comprometido, não elevando os níveis de ROS e redução do  $\Delta\Psi_m$ . Esses resultados são relevantes e abrem novas perspectivas para a investigação e o esclarecimento dos possíveis mecanismos de resistência de células tumorais em condições de hipóxia aos polissacarídeos, especialmente aqueles complexados com vanádio.

FIGURA 48 - POSSÍVEIS MECANISMOS CITOTÓXICOS INDUZIDOS PELAS PREPARAÇÕES DE GALACTOMANANAS SAGM E MSAGM:VO



FONTE: O autor (2017).

NOTA: SAGM e MSAGM:VO parecem induzir os mecanismos citotóxicos por diferentes mecanismos, porém, ambas as preparações podem permear as membranas celulares e/ou interagir com receptores de membrana como o ASGP-R. Tanto SAGM quanto MSAGM:VO parecem atuar na mitocôndria onde ocorre a inibição da respiração, consequentemente reduzindo os níveis de ATP. MSAGM:VO foi capaz de aumentar as espécies reativas de oxigênio (ROS), diminuir o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e aumentar a atividade das caspases 3 e 7. A redução no  $\Delta\Psi_m$  pode levar à liberação do citocromo c desencadeando a morte celular por apoptose. O baixo nível de lactato pode ser caracterizado por uma possível interferência na enzima responsável pela conversão de piruvato a lactato, a lactato desidrogenase A (LDH-A). SAGM aumentou os níveis de lactato devido a uma tentativa das células HepG2 em sobreviverem desviando o metabolismo para a via glicolítica. O possível aumento na via glicolítica também pode desviar para a via das pentoses fosfato (VPF), aumentando os níveis de GSH, podendo impedir a formação de ROS. O mecanismo de ação de SAGM ainda precisa ser esclarecido, embora não se descarte a possibilidade do composto levar a morte celular, porém por outro mecanismo independente dos níveis de ROS e do potencial de membrana mitocondrial. As setas pontilhadas em verde, demonstram os efeitos ocasionados por MSAGM:VO e as setas pontilhadas em cinza, destacam os efeitos observados por SAGM.

Os resultados obtidos em relação ao impacto do silenciamento da enzima Glucose – 6 – fosfato isomerase nas células LS174T podem ser visualizados na figura 49, onde estão indicados os possíveis mecanismos de interferência no metabolismo dessas células após o silenciamento.

A enzima glucose – 6 – fosfato isomerase (GPI), além de ser essencial para a glicólise, é indispensável para a gluconeogênese e para a via das pentoses fosfato. Este passo reversível da glicólise possui um papel crítico no metabolismo glicolítico, uma vez que o fluxo metabólico da glucose pode ser encaminhado para diferentes vias (via das pentoses fosfato e glicólise) dependendo das concentrações de oxigênio e glucose no microambiente e do estado de proliferação das células. A expressão da enzima GPI encontra-se aumentada em diversos tipos de cânceres (SEMENZA, 2013; PUSAPATI *et al.*, 2016), assim como a maioria das enzimas glicolíticas, GPI é induzida por cMyc (KIM *et al.*, 2004) e HIF-1 (SEMENZA, 2013).

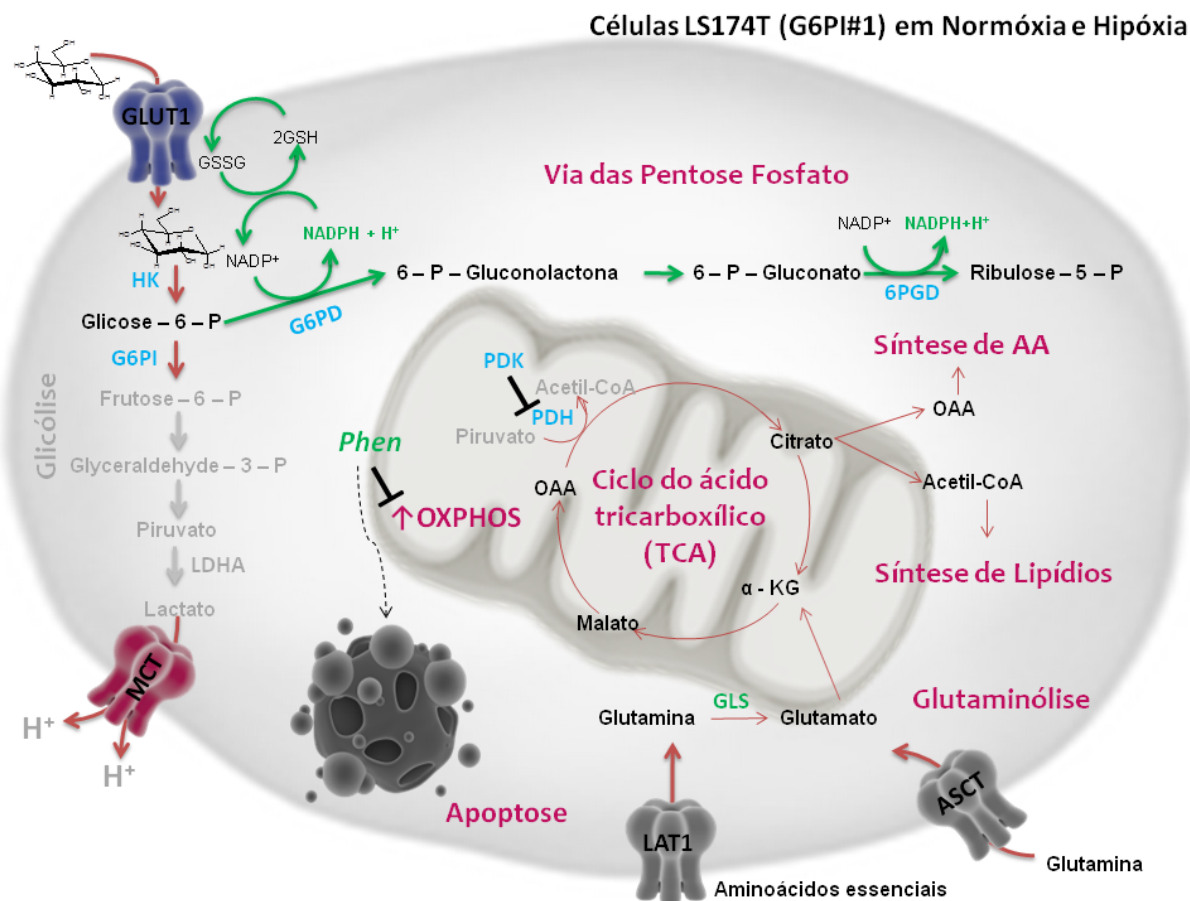
Quando comparadas as células normais, as células tumorais apresentam um rápido crescimento, uma vez que exibem uma maior dependência da glicólise. Esta condição pode ser referida como um “vício” glicolítico para a produção de ATP tornando as células tumorais mais vulneráveis a certos tipos de tratamentos (POUYSSSEGUR *et al.*, 1980a; HAY, 2016; PUSAPATI *et al.*, 2016). No entanto, embora existam muitos compostos que apresentam uma inibição da via glicolítica tanto no início como no final da via, estes são considerados tóxicos. Estes inibidores da glicólise são mais eficazes no bloqueio do crescimento do tumor devido aos seus efeitos fora do alvo. De fato, o presente trabalho revelou que a disfunção genética da glicólise fermentativa (GPIKO) não suprime o crescimento tumoral. O crescimento tumoral é reduzido apenas duas vezes *in vitro* e *in vivo* em condições normais de oxigênio, enquanto que as células GPIKO cultivadas em condições de hipoxia (1% de O<sub>2</sub>) sobrevivem completamente, porém deixam de se proliferar.

Em conjunto, os resultados destacam a plasticidade metabólica tumoral e demonstra claramente a capacidade das células tumorais altamente glicolíticas, como as células GPIKO de mudarem rapidamente o seu metabolismo para a fosforilação oxidativa, um mecanismo de resistência à inibição da glicólise fermentativa o que explicaria sua extrema sensibilidade aos inibidores da cadeia respiratória (fenformina) e à dependência de oxigênio para o crescimento. Além disso, a supressão do efeito Warburg pelo silenciamento da enzima glucose – 6 – fosfato isomerase em células LS174T, causou um impacto mínimo sobre o crescimento tumoral *in vivo*, mesmo na presença de fenformina sugerindo que GPIKO, poderia causar o desvio do metabolismo para a via das pentoses fosfato.

Contudo, esses resultados tornam-se interessante para o estabelecimento de terapias antitumorais que tem como alvo as funções mitocondriais ligadas à provisão de energia. Neste sentido, vale ressaltar os resultados obtidos no presente estudo em relação às galactomananas, em especial a galactomanana na sua forma parcialmente hidrolisada complexada com

oxovanádio (MSAGM:VO) a qual exerceu uma importante modulação na bioenergética mitocondrial das células HepG2.

FIGURA 49 - POSSÍVEIS MECANISMOS DE SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA EM CÉLULAS LS174T KO EM GPI



FONTE: O autor (2017).

NOTA: Em condições de Normóxia: após knockout na enzima GPI, sugere-se que as células têm a capacidade de alternar o metabolismo glicolítico para a fosforilação oxidativa (OXPHOS), de forma a aumentar a capacidade respiratória dessas células, bem como diminuir os níveis de lactato. Após a adição da fenformina (Phen), as células GPIKO tiveram sua capacidade respiratória inibida e neste sentido ocorreu a morte celular. Além disso, ainda é sugerido, que as células GPIKO podem também alternar o seu metabolismo para a via das pentose fosfato. Em condições de Hipóxia: após knockout na enzima GPI, sugere-se que as células não alteraram o metabolismo glicolítico para a fosforilação oxidativa (OXPHOS), uma vez que não há oxigênio suficiente. No entanto, ainda que não haja oxigênio suficiente, sugere-se que as células podem alterar o seu metabolismo para a via das pentose fosfato, de forma a utilizar tanto a fase oxidativa quanto a não oxidativa, devido ao acúmulo de glucose-6-fosfato gerado após o silenciamento da enzima GPI.

## 8. CONCLUSÕES

- 1) Dos resultados referentes à hidrólise ácida parcial da galactomanana de *S. amazonicum*, pode-se concluir que:
  - A hidrólise ácida parcial foi eficiente, a qual foi comprovada pela análise de HPSEC/MALLS/RI.
- 2) Os resultados referentes à complexação do oxovanádio com as galactomananas concluem-se que:
  - As constantes de complexação demonstraram a existência de quatro e cinco espécies em equilíbrio para sistema VO com SAGM e com MSAGM, respectivamente. Não houve diferenças entre os valores das constantes de estabilidades para ambos os equilíbrios;
- 3) Em relação aos efeitos de SAGM sobre células HepG2 pode-se concluir que:
  - A redução da viabilidade e proliferação celular após 72 h de tratamento pode estar relacionada com a inibição da respiração dessas células bem como redução dos níveis de ATP. No entanto, o aumento dos níveis de lactato pode estar associado a um provável mecanismo de sobrevivência, levando a uma ativação da via glicolítica. A galactomanana nativa não elevou os níveis de ROS e não diminuiu o  $\Delta\Psi_m$ .
- 4) Em relação aos efeitos de MSAGM:VO sobre as células HepG2 pode-se concluir que:
  - A redução da viabilidade e proliferação das células HepG2 após 72 h de tratamento pode estar relacionada com a inibição da respiração, redução dos níveis de lactato e ATP. Por sua vez, a inibição da respiração poderia causar um aumento nos níveis de ROS e a redução no  $\Delta\Psi_m$ . Além disso, o aumento na atividade das caspases 3 e 7, bem como o aumento no nível de expressão de BAX, estão associados a morte celular por apoptose, mais especificamente pela via intrínseca mitocondrial.
  - Em relação aos efeitos de MSAGM:VO em condições de hipóxia, pode-se concluir que o provável mecanismo de sobrevivência/resistência nestas condições está



relacionado com o aumento da expressão das enzimas anti-apoptóticas (Bcl-xL e Mcl-1), da modulação nos níveis de expressão HIF -1 $\alpha$  e pelo aumento da expressão da proteína LC3-II e redução de p62, caracterizando a ativação da autofagia como um mecanismo de sobrevivência.

- Embora as duas preparações SAGM e MSAGM:VO, se mostraram capazes em modular o metabolismo das células HepG2, o efeito observado por MSAGM:VO pode estar relacionado com a presença do metal.

5) Em relação ao *knockout* na enzima glucose – 6 – fosfato isomerase nas células LS174T pode-se concluir que:

- Em condições de normóxia, o comprometimento da via glicolítica foi capaz de reduzir a proliferação das células LS174T e alternar o metabolismo glicolítico para a fosforilação oxidativa. Como consequência dessa inibição, os níveis de lactato foram reduzidos, assim como ocorreu um aumento dos níveis de DNA mitocondrial. A inibição de fosforilação oxidativa com a fenformina, um inibidor do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, foi capaz de induzir a morte celular por apoptose.
- Em condições de hipóxia a redução da proliferação das células LS174T foi mais expressiva, uma vez que as células não tiveram a capacidade de alternar o seu metabolismo para a fosforilação oxidativa. Neste sentido, um possível mecanismo de sobrevivência dessas células, estaria relacionado com a capacidade das células em utilizarem a via das pentoses fosfato.

## REFERÊNCIAS

- ABAKUMOVA, O. Y.; PODOBED, O. V.; BELAYEVA, N. F.; TOCHILKIN, A. I. Anticancer activity of oxovanadium compounds. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**. v. 6, n. 2, p. 164-170, 2012.
- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in carbohydrate chemistry**. v. 5, n. p. 269 - 280, 1965.
- ADRIAZOLA, I. O.; AMARAL, A. E. D.; AMORIM, J. C.; CORREIA, B. L.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; NOLETO, G. R. Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex in vitro. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 132, n. p. 45-51, 2014.
- AGRAWAL, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**. v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.
- AHMAD, A.; ABOUKAMEEL, A.; KONG, D.; WANG, Z.; SETHI, S.; CHEN, W.; SARKAR, F. H.; RAZ, A. Phosphoglucose Isomerase/Autocrine Motility Factor Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition Regulated by miR-200 in Breast Cancer Cells. **Cancer Research**. v. 71, n. 9, p. 3400-3409, 2011.
- ALDERIGHI, L.; GANS, P.; IENCO, A.; PETERS, D.; SABATINI, A.; VACCA, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 184, n. 1, p. 311-318, 1999.
- ALMUHAIDEB, A.; PAPATHANASIOU, N.; BOMANJI, J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. **Annals of Saudi Medicine**. v. 31, n. 1, p. 3 - 13, 2011.
- AMARAL, A. E. D.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; MARTINEZ, G. R.; MERLIN ROCHA, M. E.; CADENA, S. M. S. C.; NOLETO, G. R. Leishmanicidal activity of polysaccharides and their oxovanadium(IV/V) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 90, n. p. 732-741, 2015.
- ASHIQ, U.; ARA JAMAL, R.; AHMED MESAİK, M.; MAHROOF-TAHIR, M.; SHAHID, S.; MOHAMMED KHAN, K. Synthesis, Immunomodulation and Cytotoxic Effects of Vanadium (IV) Complexes. **Medicinal Chemistry**. v. 10, n. 3, p. 287-299, 2014.
- AZAD, M. B.; CHEN, Y.; GIBSON, S. B. Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 11, n. 4, p. 2009.
- BANASIAK, D.; BARNETSON, A. R.; ODELL, R. A.; MAMEGHAN, H.; RUSSELL, P. J. Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. **Radiation Oncology Investigations**. v. 7, n. 2, p. 77-85, 1999.
- BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 80, n. 1-2, p. 1-10, 2000.
- BARAN, E. J. REVIEW: SPECTROSCOPIC STUDIES OF OXOVANADIUM COORDINATION COMPOUNDS. **Journal of Coordination Chemistry**. v. 54, n. 3-4, p. 215-238, 2001.

- BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) complexes of carbohydrates: A brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, n. 4, p. 547-553, 2009.
- BARCELOUX, D. G.; BARCELOUX, D. Vanadium. **Clin Toxicol**. v. 37, n. p. 1999.
- BELLOT, G.; GARCIA-MEDINA, R.; GOUNON, P.; CHICHE, J.; ROUX, D.; POUYSSÉGUR, J.; MAZURE, N. M. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. **Molecular and cellular biology**. v. 29, n. 10, p. 2570-2581, 2009.
- BELLOT, G. L.; LIU, D.; PERVAIZ, S. ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master? **Mitochondrion**. v. 13, n. 3, p. 155-162, 2013.
- BENTO, J. F.; MAZZARO, I.; DE ALMEIDA SILVA, L. M.; DE AZEVEDO MOREIRA, R.; FERREIRA, M. L. C.; REICHER, F.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymers**. v. 92, n. 1, p. 192-199, 2013.
- BILTON, R.; MAZURE, N.; TROTTIER, E.; HATTAB, M.; DERY, M. A.; RICHARD, D. E. Arrest-defective-1 protein, an acetyltransferase, does not alter stability of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and is not induced by hypoxia or HIF. **J Biol Chem**. v. 280, n. p. 2005.
- BISHAYEE, A.; CHATTERJEE, M. Time course effects of vanadium supplement on cytosolic reduced glutathione level and glutathione S-transferase activity. **Biological Trace Element Research**. v. 48, n. 3, p. 275, 1995.
- BISHAYEE, A.; WAGHRAY, A.; PATEL, M. A.; CHATTERJEE, M. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. **Cancer Letters**. v. 294, n. 1, p. 1-12, 2010.
- BJØRKØY, G.; LAMARK, T.; PANKIV, S.; ØVERVATN, A.; BRECH, A.; JOHANSEN, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. Methods in Enzymology, Academic Press. **Volume 452**: 181-197.
- BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Pythium aphanidermatum: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1  $\rightarrow$  3),(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -d-glucans. **Carbohydrate Research**. v. 231, n. p. 293-307, 1992.
- BOARD, M.; HUMM, S.; NEWSHOLME, E. A. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. **Biochemical Journal**. v. 265, n. 2, p. 503-509, 1990.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 $\rightarrow$ 3) –  $\beta$  – D – Glucans Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28, n. p. 3-14, 1995.
- BOUDREAU, A.; PURKEY, H. E.; HITZ, A.; ROBARGE, K.; PETERSON, D.; LABADIE, S.; KWONG, M.; HONG, R.; GAO, M.; DEL NAGRO, C.; PUSAPATI, R.; MA, S.; SALPHATI, L.; PANG, J.; ZHOU, A.; LAI, T.; LI, Y.; CHEN, Z.; WEI, B.; YEN, I.; SIDERIS, S.; MCCLELAND, M.; FIRESTEIN, R.; CORSON, L.; VANDERBILT, A.; WILLIAMS, S.; DAEMEN, A.; BELVIN, M.; EIGENBROT, C.; JACKSON, P. K.; MALEK, S.; HATZIVASSILIOU, G.; SAMPATH, D.; EVANGELISTA, M.; O'BRIEN, T. Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition. **Nat Chem Biol**. v. 12, n. 10, p. 779-786, 2016.
- BRACKEN, W. M.; SHARMA, R. P.; ELSNER, Y. Y. Vanadium accumulation and subcellular distribution in relation to vanadate induced cytotoxicity in vitro. **Cell Biology and Toxicology**. v. 1, n. 4, p. 259-268, 1985.

BRAHIMI-HORN, M. C.; BELLOT, G.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 21, n. 1, p. 67-72, 2011.

BRAHIMI-HORN, M. C.; BEN-HAIL, D.; ILIE, M.; GOUNON, P.; ROULEAU, M.; HOFMAN, V.; DOYEN, J.; MARI, B.; SHOSHAN-BARMATZ, V.; HOFMAN, P.; POUYSSEGUR, J.; MAZURE, N. M. Expression of a Truncated Active Form of VDAC1 in Lung Cancer Associates with Hypoxic Cell Survival and Correlates with Progression to Chemotherapy Resistance. **Cancer Research**. v. 72, n. 8, p. 2140-2150, 2012.

BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia and cancer. **Mol Med (Berl)**. v. 85, n. p. 2007.

BRAND, A.; SINGER, K.; KOEHL, G. E.; KOLITZUS, M.; SCHOENHAMMER, G.; THIEL, A.; MATOS, C.; BRUSS, C.; KLOBUCH, S.; PETER, K.; KASTENBERGER, M.; BOGDAN, C.; SCHLEICHER, U.; MACKENSEN, A.; ULLRICH, E.; FICHTNER-FEIGL, S.; KESSELRING, R.; MACK, M.; RITTER, U.; SCHMID, M.; BLANK, C.; DETTMER, K.; OEFNER, P. J.; HOFFMANN, P.; WALENTA, S.; GEISSLER, E. K.; POUYSSEGUR, J.; VILLUNGER, A.; STEVEN, A.; SELIGER, B.; SCHREML, S.; HAFERKAMP, S.; KOHL, E.; KARRER, S.; BERNEBURG, M.; HERR, W.; MUELLER-KLIESER, W.; RENNER, K.; KREUTZ, M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. **Cell Metab**. v. 24, n. 5, p. 657-671, 2016.

BROWN, J. M.; WILSON, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. **Nat Rev Cancer**. v. 4, n. 6, p. 437-447, 2004.

BROWN, J. M. A., L. D. . The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**. v. 5, n. p. 231-237, 2005.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**. v. 117, n. 1-2, p. 33-43, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C.; DE LIMA, D. U. (2000). Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. Developments in Crop Science. ANIL KUMAR, G. and NARINDER, K., Elsevier. **Volume 26**: 283-316.

BUENDIA, M. A.; NEUVEUT, C. Hepatocellular Carcinoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 5, n. 2, p. 1-11, 2015.

CAIRNS, R. A.; MAK, T. W. The current state of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**. v. 16, n. 10, p. 613-614, 2016.

CALABRESI, F.; GAMUCCI, T. Biological response modifiers. **Lung Cancer**. v. 12, n. p. 193-198, 1995.

CANTLEY, L. C.; AISEN, P. The fate of cytoplasmic vanadium. Implications on (NA,K)-ATPase inhibition. **Journal of Biological Chemistry**. v. 254, n. 6, p. 1781-1784, 1979.

CARVALHO, P. E. R. (2007). Paricá - *Schizolobium amazonicum*. Embrapa Florestas EMBRAPA. Colombo (Paraná): 1 - 8.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology in Vitro** v. 12, n. p. 251 - 258, 1998.

CHICHE, J.; ROULEAU, M.; GOUNON, P.; BRAHIMI-HORN, M. C.; POUYSSÉGUR, J.; MAZURE, N. M. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. **Journal of Cellular Physiology**. v. n. p. n/a-n/a, 2009.

CHRESTANI, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE ANDRADE UCHOA, D. E.; NOZAWA, C.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; ONO, L. In vitro antiherpetic and antiretroviral activities of a sulfate prepared from Mimosa scabrella galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 45, n. 5, p. 453-457, 2009.

CHRISTENSEN, A. T.; MCLAUCHLAN, C. C.; DOLBECQ, A.; MIALANE, P.; JONES, M. A. Studies of the Effectiveness of Bisphosphonate and Vanadium-Bisphosphonate Compounds In Vitro against Axenic Leishmania tarentolae. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, n. p. 12, 2016.

CORMERAIS, Y.; GIULIANO, S.; LEFLOCH, R.; FRONT, B.; DURIVAUT, J.; TAMBUTTÉ, E.; MASSARD, P.-A.; DE LA BALLINA, L. R.; ENDOU, H.; WEMPE, M. F.; PALACIN, M.; PARKS, S. K.; POUYSSÉGUR, J. Genetic Disruption of the Multifunctional CD98/LAT1 Complex Demonstrates the Key Role of Essential Amino Acid Transport in the Control of mTORC1 and Tumor Growth. **Cancer Research**. v. 76, n. 15, p. 4481-4492, 2016.

CORNMAN, C. R.; ZOVINKA, E. P.; BOYAJIAN, Y. D.; GEISER-BUSH, K. M.; BOYLE, P. D.; SINGH, P. Structural and EPR Studies of Vanadium Complexes of Deprotonated Amide Ligands: Effects on the 51V Hyperfine Coupling Constant. **Inorganic Chemistry**. v. 34, n. 16, p. 4213-4219, 1995.

COSTA PESSOA, J.; GARRIBBA, E.; SANTOS, M. F. A.; SANTOS-SILVA, T. Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 301-302, n. p. 49-86, 2015.

CRANS, D. C.; SMEE, J. J.; GAIDAMAUSKAS, E.; YANG, L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. **Chemical Reviews**. v. 104, n. 2, p. 849-902, 2004.

CRANS, D. C.; YANG, L.; JAKUSCH, T.; KISS, T. Aqueous Chemistry of Ammonium (Dipicolinato)oxovanadate(V): The First Organic Vanadium(V) Insulin-Mimetic Compound. **Inorganic Chemistry**. v. 39, n. 20, p. 4409-4416, 2000.

CUI, H.; WU, S.; SUN, Y.; WANG, T.; LI, Z.; CHEN, M.; WANG, C. Polysaccharide from Pleurotus nebrodensis induces apoptosis via a mitochondrial pathway in HepG2 cells. **Food Funct.** v. 7, n. 1, p. 455-463, 2016.

CUNHA - DE PADUA, M. M.; SUTER CORREIA CADENA, S. M.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L.; MARTINEZ, G. R.; RODRIGUES NOLETO, G. Galactomannan from Schizolobium amazonicum seed and its sulfated derivatives impair metabolism in HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 101, n. p. 464-473, 2017.

CUNHA, M. M. EFEITOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum* E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2). Mestrado em Ciências - Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Setor de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CUSIMANO, A.; PULEIO, R.; D'ALESSANDRO, N.; LORIA, G. R.; MCCUBREY, J. A.; MONTALTO, G.; CERVELLO, M. Cytotoxic activity of the novel small molecule AKT inhibitor SC66 in hepatocellular carcinoma cells. **Oncotarget**. v. 6, n. 3, p. 1707-1722, 2015.

CZERNIN, J.; PHELPS, M. E. Positron emission tomography scanning: current and future applications. **Annu. Rev. Med.** . v. 53, n. 89 - 112, p. 2002.

CZOC, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and d-glycerate-2-phosphate. **Methods in enzymatic analysis**. v. 3, n. p. 1446-1451, 1974.

DANG, C. V.; KIM, J.-W.; GAO, P.; YUSTEIN, J. The interplay between MYC and HIF in cancer. **Nat Rev Cancer**. v. 8, n. 1, p. 51-56, 2008.

DANG, C. V.; LE, A.; GAO, P. MYC-induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 15, n. 21, p. 6479-6483, 2009.

DAS, M. R.; BAG, A. K.; SAHA, S.; GHOSH, A.; DEY, S. K.; DAS, P.; MANDAL, C.; RAY, S.; CHAKRABARTI, S.; RAY, M.; JANA, S. S. Molecular association of glucose-6-phosphate isomerase and pyruvate kinase M2 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cancer cells. **BMC Cancer**. v. 16, n. p. 152, 2016.

DE PRETER, G.; NEVEU, M.-A.; DANHIER, P.; BRISSON, L.; PAYEN, V. L.; PORPORATO, P. E.; JORDAN, B. F.; SONVEAUX, P.; GALLEZ, B. Inhibition of the pentose phosphate pathway by dichloroacetate unravels a missing link between aerobic glycolysis and cancer cell proliferation. **Oncotarget**. v. 7, n. 3, p. 2910-2920, 2016.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. (1975). Chemistry and Interactions of Seed Galactomannans. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. TIPSON, R. S. and DEREK, H., Academic Press. **Volume 31**: 241-312.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**. v. 2, n. 5, p. 2016.

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**. v. 7, n. 1, p. 11-20, 2008.

DO ROSÁRIO, M. M. T.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DO AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. **Chemico-Biological Interactions**. v. 189, n. 1-2, p. 127-133, 2011.

DOHERTY, J. R.; YANG, C.; SCOTT, K. E.; CAMERON, M. D.; FALLAHI, M.; LI, W.; HALL, M. A.; AMELIO, A. L.; MISHRA, J. K.; LI, F.; TORTOSA, M.; GENAU, H. M.; ROUNBEHLER, R. J.; LU, Y.; DANG, C. V.; KUMAR, K. G.; BUTLER, A. A.; BANNISTER, T. D.; HOOPER, A. T.; UNSAL-KACMAZ, K.; ROUSH, W. R.; CLEVELAND, J. L. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. **Cancer Res**. v. 74, n. 3, p. 908-920, 2014.

DYSON, J.; JAQUES, B.; CHATTOPADYHAY, D.; LOCHAN, R.; GRAHAM, J.; DAS, D.; ASLAM, T.; PATANWALA, I.; GAGGAR, S.; COLE, M.; SUMPTER, K.; STEWART, S.; ROSE, J.; HUDSON, M.; MANAS, D.; REEVES, H. L. Hepatocellular cancer: The impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. **Journal of Hepatology**. v. 60, n. 1, p. 110-117, 2014.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, n. 6, p. 663-669, 2004.

EL-SERAG, H. B.; KANWAL, F.; RICHARDSON, P.; KRAMER, J. Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virological response in Veterans with hepatitis C virus infection. **Hepatology**. v. 64, n. 1, p. 130-137, 2016.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 42, n. p. 249-265, 2002.

FAGGIO, C.; PAGANO, M.; DOTTORE, A.; GENOVESE, G.; MORABITO, M. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. **Natural Product Research**. v. 30, n. 17, p. 1934-1937, 2016.

FAN, S.; ZHANG, J.; NIE, W.; ZHOU, W.; JIN, L.; CHEN, X.; LU, J. Antitumor effects of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 102, n. p. 53-62, 2017.

FANTIN, V. R.; ST-PIERRE, J.; LEDER, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. **Cancer Cell**. v. 9, n. 6, p. 425-434, 2006.

FARIAS, C. L. A. **XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO (IV/V): EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10 IN VITRO**. Mestrado em Ciências - Bioquímica. Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica (Setor de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

FATTOVICH, G.; STROFFOLINI, T.; ZAGNI, I.; DONATO, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. **Gastroenterology**. v. 127, n. 5, Supplement 1, p. S35-S50, 2004.

FERNANDES, K. L. M. **ALTERAÇÕES NA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E TOXICIDADE EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2) PROMOVIDAS POR UMA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) E SEU COMPLEXO COM OXOVANÁDIO IV/V (XGC:VO)** Mestrado em Ciências-Bioquímica Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Setor de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

FERREIRA, L. M. Cancer metabolism: the Warburg effect today. **Exp Mol Pathol**. v. 89, n. 3, p. 372-380, 2010.

FORNER, A.; REIG, M.; VARELA, M.; BURREL, M.; FELIU, J.; BRICEÑO, J.; SASTRE, J.; MARTÍ-BONMATI, L.; LLOVET, J. M.; BILBAO, J. I.; SANGRO, B.; PARDO, F.; AYUSO, C.; BRU, C.; TABERNERO, J.; BRUIX, J. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH. **Medicina Clínica (English Edition)**. v. 146, n. 11, p. 511.e511-511.e522, 2016.

FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; PING DOU, Q. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design**. v. 16, n. 16, p. 1813-1825, 2010.

FRIEDMAN, M. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. **Foods**. v. 5, n. 4, p. 80, 2016.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 9, n. 6, p. 447-464, 2010.

FUNASAKA, T.; HOGAN, V.; RAZ, A. Phosphoglucose Isomerase/Autocrine Motility Factor Mediates Epithelial and Mesenchymal Phenotype Conversions in Breast Cancer. **Cancer Research**. v. 69, n. 13, p. 5349-5356, 2009.

FUNASAKA, T.; HU, H.; HOGAN, V.; RAZ, A. Down-regulation of Phosphoglucose Isomerase/Autocrine Motility Factor Expression Sensitizes Human Fibrosarcoma Cells to Oxidative Stress Leading to Cellular Senescence. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 50, p. 36362-36369, 2007a.

FUNASAKA, T.; HU, H.; YANAGAWA, T.; HOGAN, V.; RAZ, A. Down-Regulation of Phosphoglucose Isomerase/Autocrine Motility Factor Results in Mesenchymal-to-Epithelial Transition of Human Lung Fibrosarcoma Cells. **Cancer Research**. v. 67, n. 9, p. 4236-4243, 2007b.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**. v. 13, n. p. 2012a.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; TROJEL-HANSEN, C.; KROEMER, G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. **Circ Res**. v. 111, n. p. 2012b.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; AMER, H.; HELMY, W. A. Cancer chemopreventive and anti-inflammatory activities of chemically modified guar gum. **Chemico-Biological Interactions**. v. 161, n. 3, p. 229-240, 2006.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; AMER, H.; HELMY, W. A.; TALAAT, R. M.; RAGAB, H. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. **International Immunopharmacology**. v. 7, n. 6, p. 871-878, 2007.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S.; GESCHWIND, J.-F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. **Molecular Cancer**. v. 12, n. p. 152-152, 2013.

GANS, P.; SABATINI, A.; VACCA, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. **Talanta**. v. 43, n. 10, p. 1739-1753, 1996.

GANTER, J. L.; PETKOWICZ, C. L.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 17, n. 1, p. 13-19, 1995.

GAO, J.-L.; CHEN, Y.-G. Natural Compounds Regulate Glycolysis in Hypoxic Tumor Microenvironment. **BioMed Research International**. v. 2015, n. p. 354143, 2015.

GAO, W.; XU, K.; LI, P.; TANG, B. Functional roles of superoxide and hydrogen peroxide generated by mitochondrial DNA mutation in regulating tumorigenicity of HepG2 cells. **Cell Biochemistry and Function**. v. 29, n. 5, p. 400-407, 2011.

GARTI, N.; MADAR, Z.; ASERIN, A.; STERNHEIM, B. Fenugreek Galactomannans as Food Emulsifiers. **LWT - Food Science and Technology**. v. 30, n. 3, p. 305-311, 1997.

GARTI, N.; REICHMAN, D. Surface properties and emulsification activity of galactomannans. **Food Hydrocolloids**. v. 8, n. 2, p. 155-173, 1994.



GNAIGER, E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. **Respiration Physiology**. v. 128, n. 3, p. 277-297, 2001.

GOHIL, V. M.; SHETH, S. A.; NILSSON, R.; WOJTOVICH, A. P.; LEE, J. H.; PEROCCHI, F.; CHEN, W.; CLISH, C. B.; AYATA, C.; BROOKES, P. S.; MOOTHA, V. K. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nat Biotech**. v. 28, n. 3, p. 249-255, 2010.

GOLDWASER, I.; QIAN, S.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M.; SHECHTER, Y. Organic Vanadium Chelators Potentiate Vanadium-Evoked Glucose Metabolism In Vitro and In Vivo: Establishing Criteria for Optimal Chelators. **Molecular Pharmacology**. v. 58, n. 4, p. 738-746, 2000.

GOTTLIEB, E.; ARMOUR, S.; HARRIS, M.; THOMPSON, C. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**. v. 10, n. 6, p. 709-717, 2003.

GRANJA, S.; MARCHIQ, I.; BALTAZAR, F.; POUYSSSEGUR, J. Gene disruption using zinc finger nuclease technology. **Methods Mol Biol**. v. 1165, n. p. 253-260, 2014.

GREEN, D. R. Cancer and Apoptosis: Who Is Built to Last? **Cancer Cell**. v. 31, n. 1, p. 2-4, 2017.  
GRUZEWSKA, K.; MICHNO, A.; PAWELCYK, T.; BIELARCZYK, H. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. **Journal of physiology and pharmacology** v. 65, n. 5, p. 603-611, 2014.

GUO, F. C.; WILLIAMS, B. A.; KWAKKEL, R. P.; LI, H. S.; LI, X. P.; LUO, J. Y.; LI, W. K.; VERSTEGEN, M. W. A. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 83, n. 2, p. 175-182, 2004.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods in enzymatic analysis**. v. 3, n. p. 1464-1469, 1974.

GYURCSIK, B.; NAGY, L. Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 203, n. 1, p. 81-149, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**. v. 401, n. 1, p. 1-11, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. v. 100, n. p. 57 - 60 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARDWICK, J. M.; SOANE, L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 5, n. 2, p. a008722-a008722, 2013.

HARRIS, W. R. Thermodynamics of anion binding to human serum transferrin. **Biochemistry**. v. 24, n. 25, p. 7412-7418, 1985.

HARTMANS, S.; DE VRIES, H. T.; BEIJER, P.; BRADY, R. L.; HOFBAUER, M.; HAANDRIKMAN, A. J. (2003). Production of Oxidized Guar Galactomannan and Its Applications in the Paper Industry. Hemicelluloses: Science and Technology, American Chemical Society. **864**: 360-371.

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nat Rev Cancer**. v. 16, n. 10, p. 635-649, 2016.

HORECKER, B. L. The Pentose Phosphate Pathway. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 50, p. 47965-47971, 2002.

HOSSEINI, M.-J.; SHAKI, F.; GHAZI-KHANSARI, M.; POURAHMAD, J. Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. **Metallomics**. v. 5, n. 2, p. 152-166, 2013.  
HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. **Cell**. v. 134, n. 5, p. 703-707, 2008.

HUANG, F.; ZHANG, R.; LIU, Y.; XIAO, J.; LIU, L.; WEI, Z.; YI, Y.; ZHANG, M.; LIU, D. Dietary litchi pulp polysaccharides could enhance immunomodulatory and antioxidant effects in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 92, n. p. 1067-1073, 2016.

HUANG, L. E.; GU, J.; SCHAU, M.; BUNN, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, n. 14, p. 7987-7992, 1998.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. v. 1807, n. 6, p. 735-745, 2011.

JIA, X.; ZHANG, C.; QIU, J.; WANG, L.; BAO, J.; WANG, K.; ZHANG, Y.; CHEN, M.; WAN, J.; SU, H.; HAN, J.; HE, C. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root. **Carbohydrate Polymers**. v. 132, n. p. 67-71, 2015.

JIANG, P.; DONG, Z.; MA, B.; NI, Z.; DUAN, H.; LI, X.; WANG, B.; MA, X.; WEI, Q.; JI, X.; LI, M. Effect of Vanadyl Rosiglitazone, a New Insulin-Mimetic Vanadium Complexes, on Glucose Homeostasis of Diabetic Mice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. n. p. 1-11, 2016.

JIANG, P.; DU, W.; WU, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. **Protein & Cell**. v. 5, n. 8, p. 592-602, 2014.

JOSEPH, M. M.; ARAVIND, S. R.; GEORGE, S. K.; RAVEENDRAN PILLAI, K.; MINI, S.; SREELEKHA, T. T. Anticancer activity of galactoxyloglucan polysaccharide-conjugated doxorubicin nanoparticles: Mechanistic insights and interactome analysis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 93, n. p. 183-195, 2015.

JOSEPH, M. M.; ARAVIND, S. R.; GEORGE, S. K.; VARGHESE, S.; SREELEKHA, T. T. A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts in vitro and in vivo anticancer activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 98, n. 2, p. 1466-1475, 2013.

JUNGWIRTH, U.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K.; HARTINGER, C. G.; BERGER, W.; HEFFETER, P. Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 15, n. 4, p. 1085-1127, 2011.

KALBACOVA, M.; VRBACKY, M.; DRAHOTA, Z.; MELKOVA, Z. Comparison of the effect of mitochondrial inhibitors on mitochondrial membrane potential in two different cell lines using flow cytometry and spectrofluorometry. **Cytometry A**. v. 52, n. 2, p. 110-116, 2003.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J. A.; DENNERY, P. A.; FORMAN, H. J.; GRISHAM, M. B.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology & medicine**. v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KANEO, Y.; TANAKA, T.; NAKANO, T.; YAMAGUCHI, Y. Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats. **Journal of Controlled Release**. v. 70, n. 3, p. 365-373, 2001.

KAPLON, J.; ZHENG, L.; MEISSEL, K.; CHANETON, B.; SELIVANOV, V. A.; MACKAY, G.; VAN DER BURG, S. H.; VERDEGAAL, E. M. E.; CASCANTE, M.; SHLOMI, T.; GOTTLIEB, E.; PEEPER, D. S. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. **Nature**. v. 498, n. 7452, p. 109-112, 2013.

KIM, J.-W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**. v. 3, n. 3, p. 177-185, 2006.

KIM, J. W.; ZELLER, K. I.; WANG, Y.; JEGGA, A. G.; ARONOW, B. J.; O'DONNELL, K. A.; DANG, C. V. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. **Mol Cell Biol**. v. 24, n. 13, p. 5923-5936, 2004.

KIOSEOGLOU, E.; PETANIDIS, S.; GABRIEL, C.; SALIFOGLU, A. The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 301-302, n. p. 87-105, 2015.

KONDO, Y.; KANZAWA, T.; SAWAYA, R.; KONDO, S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 5, n. 9, p. 726-734, 2005.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**. v. 11, n. 5, p. 325-337, 2011.

KORBECKI, J.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; GUTOWSKA, I.; CHLUBEK, D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 59, n. 2, p. 195-200, 2012.

KORDOWIAK, A. M.; KLEIN, A.; GOC, A.; DABROŚ, W. Comparison of the effect of  $\text{VOSO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and  $\text{NaVO}_3$  on proliferation, viability and morphology of H35-19 rat hepatoma cell line. **Pol J Pathol**. v. 58, n. 1, p. 51 - 57 2007.

KOTHANDARAMAN, G. P.; RAVICHANDRAN, V.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M.; JAYAKRISHNAN, A. Anti-fungal and anti-leishmanial activities of pectin-amphotericin B conjugates. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 39, n. p. 1-7, 2017.

KREMER, L. E.; MCLEOD, A. I.; AITKEN, J. B.; LEVINA, A.; LAY, P. A. Vanadium(V) and -(IV) complexes of anionic polysaccharides: Controlled release pharmaceutical formulations and models of vanadium biotransformation products. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 147, n. p. 227-234, 2015.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**. v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell**. v. 13, n. 6, p. 472-482, 2008.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal Biochem**. v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

KULICKE, W.-M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)-β-d-glucans. **Carbohydrate Research**. v. 297, n. 2, p. 135-143, 1997.

KUZNETSOV, A. V.; VEKSLER, V.; GELLERICH, F. N.; SAKS, V.; MARGREITER, R.; KUNZ, W. S. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nat. Protocols**. v. 3, n. 6, p. 965-976, 2008.

LAI, C.-H.; LIN, C.-Y.; WU, H.-T.; CHAN, H.-S.; CHUANG, Y.-J.; CHEN, C.-T.; LIN, C.-C. Galactose Encapsulated Multifunctional Nanoparticle for HepG2 Cell Internalization. **Advanced Functional Materials**. v. 20, n. 22, p. 3948-3958, 2010.

LE, A.; COOPER, C. R.; GOUW, A. M.; DINAVAH, R.; MAITRA, A.; DECK, L. M.; ROYER, R. E.; VANDER JAGT, D. L.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, n. 5, p. 2037-2042, 2010.

LE FLOCH, R.; CHICHE, J.; MARCHIQ, I.; NAIKEN, T.; ILC, K.; MURRAY, C. M.; CRITCHLOW, S. E.; ROUX, D.; SIMON, M. P.; POUYSSEGUR, J. CD147 subunit of lactate/H<sup>+</sup> symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 108, n. 40, p. 16663-16668, 2011.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**. v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LEE, J. G.; SHIN, J. H.; SHIM, H. S.; LEE, C. Y.; KIM, D. J.; KIM, Y. S.; CHUNG, K. Y. Autophagy contributes to the chemo-resistance of non-small cell lung cancer in hypoxic conditions. **Respiratory Research**. v. 16, n. p. 138, 2015.

LEÓN, I. E.; BUTENKO, N.; DI VIRGILIO, A. L.; MUGLIA, C. I.; BARAN, E. J.; CAVACO, I.; ETCHEVERRY, S. B. Vanadium and cancer treatment: Antitumoral mechanisms of three oxidovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 134, n. p. 106-117, 2014.

LEPENIES, B.; LEE, J.; SONKARIA, S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 65, n. 9, p. 1271-1281, 2013.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**. v. 105, n. 2, p. 101-114, 2006.

LI, C.; HUANG, Q.; XIAO, J.; FU, X.; YOU, L.; LIU, R. H. Preparation of *Prunella vulgaris* polysaccharide-zinc complex and its antiproliferative activity in HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 91, n. p. 671-679, 2016.

LI, L.; FATH, M. A.; SCARBROUGH, P. M.; WATSON, W. H.; SPITZ, D. R. Combined inhibition of glycolysis, the pentose cycle, and thioredoxin metabolism selectively increases cytotoxicity and oxidative stress in human breast and prostate cancer. **Redox Biology**. v. 4, n. p. 127-135, 2015.

LI, N.; CHEN, Y.; ZHANG, Y.-M.; YANG, Y.; SU, Y.; CHEN, J.-T.; LIU, Y. Polysaccharide-Gold Nanocluster Supramolecular Conjugates as a Versatile Platform for the Targeted Delivery of Anticancer Drugs. **Scientific Reports**. v. 4, n. p. 4164, 2014.

LIAO, W.; LU, Y.; FU, J.; NING, Z.; YANG, J.; REN, J. Preparation and Characterization of *Dictyophora indusiata* Polysaccharide-Zinc Complex and Its Augmented Antiproliferative Activity on

Human Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, n. 29, p. 6525-6534, 2015.

LIU, J.; WILLFÖR, S.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. v. 5, n. 1, p. 31-61, 2015a.

LIU, S.; LIU, G.; YI, Y. Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: Synthesis, characterization, and biological activities. **Carbohydrate Polymers**. v. 121, n. p. 86-91, 2015b.

LOZY, F.; KARANTZA, V. Autophagy and cancer cell metabolism. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 23, n. 4, p. 395-401, 2012.

MACARA, I. G.; KUSTIN, K.; CANTLEY JR, L. C. Glutathione reduces cytoplasmic vanadate mechanism and physiological implications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 629, n. 1, p. 95-106, 1980.

MAES, H.; RUBIO, N.; GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. **Trends in Molecular Medicine**. v. 19, n. 7, p. 428-446, 2013.

MALDONADO, E. N.; LEMASTERS, J. J. Warburg Revisited: Regulation of Mitochondrial Metabolism by Voltage-Dependent Anion Channels in Cancer Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 342, n. 3, p. 637-641, 2012.

MARCHIQ, I.; LE FLOCH, R.; ROUX, D.; SIMON, M. P.; POUYSSEUR, J. Genetic Disruption of Lactate/H<sup>+</sup> Symporters (MCTs) and Their Subunit CD147/BASIGIN Sensitizes Glycolytic Tumor Cells to Phenformin. **Cancer Research**. v. 75, n. 1, p. 171-180, 2014.

MARCHIQ, I.; LE FLOCH, R.; ROUX, D.; SIMON, M. P.; POUYSSEUR, J. Genetic disruption of lactate/H<sup>+</sup> symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. **Cancer Res**. v. 75, n. 1, p. 171-180, 2015.

MARCHIQ, I.; POUYSSEUR, J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H<sup>+</sup> symporters. **Journal of Molecular Medicine**. v. n. p. 1-17, 2015.

MARRERO, J. A.; FONTANA, R. J.; FU, S.; CONJEEVARAM, H. S.; SU, G. L.; LOK, A. S. Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**. v. 42, n. 2, p. 218-224, 2005.

MARROQUIN, L. D.; HYNES, J.; DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; WILL, Y. Circumventing the Crabtree Effect: Replacing Media Glucose with Galactose Increases Susceptibility of HepG2 Cells to Mitochondrial Toxicants. **Toxicological Sciences**. v. 97, n. 2, p. 539-547, 2007.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; PEIRIS-PAGÉS, M.; PESTELL, R. G.; SOTGIA, F.; LISANTI, M. P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. n. p. 2016.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **Int J Biol Macromol** v. 35, n. p. 97-102, 2005.

MATES, J., M. ; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**. v. 32, n. 8, p. 595 - 603, 1999.

- MATHEW, R.; WHITE, E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 21, n. 1, p. 113-119, 2011.
- MCNEILL, J. H.; YUEN, V. G.; HOVEYDA, H. R.; ORVIG, C. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 35, n. 8, p. 1489-1491, 1992.
- MERCÊ, A. L. R.; SPIR, I. H. Z.; ORUÑA SALMÓN, M. J.; GIANNONI, R. A.; MANGRICH, A. S. Model compounds of humic acid and oxovanadium cations. Potentiometric titration and EPR spectroscopy studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 10, n. p. 463-468, 1999.
- MESMER, R.; BAES, C. The hydrolysis of cations. **Wiley: New York**. v. n. p. 1976.
- MISAKI, A. (1993). Structural Aspects of Some Functional Polysaccharides. Food Hydrocolloids. NISHINARI, K. and DOI, E., Springer US: 1-19.
- MORENO-SANCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S.; MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; SAAVEDRA, E. Energy metabolism in tumor cells. **The FEBS Journal** v. 274, n. p. 1393 - 1418, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOURA NETO, E.; SOMBRA, V. G.; RICHTER, A. R.; ABREU, C. M. W. S.; MACIEL, J. S.; CUNHA, P. L. R.; ONO, L.; SIERAKOWSKI, M. R.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**. v. 101, n. p. 1013-1017, 2014.
- MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications—A Review. **Journal of Food Science and Technology**. v. 51, n. 3, p. 409-418, 2014.
- MUKHERJEE, B.; PATRA, B.; MAHAPATRA, S.; BANERJEE, P.; TIWARI, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium—an element of atypical biological significance. **Toxicology Letters**. v. 150, n. 2, p. 135-143, 2004.
- MUNOZ-PINEDO, C.; EL MJYAD, N.; RICCI, J. E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. **Cell Death and Dis**. v. 3, n. p. e248, 2012.
- NAGY, L.; SZORCSIK, A. Equilibrium and structural studies on metal complexes of carbohydrates and their derivatives. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 89, n. 1-2, p. 1-12, 2002.
- NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**. v. 6, n. 5, p. 399-403, 1991.
- NAUTS, H. C.; SWIFT, W. E.; COLEY, B. L. The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M.D., Reviewed in the Light of Modern Research. **Cancer Research**. v. 6, n. 4, p. 205-216, 1946.
- NOLETO, G. R. **EFEITO DE MANANA, GALACTOMANANA E SEUS COMPLEXOS COM ÍON VANADILO SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS E *Leishmania amazonensis***. Doutorado. Departamento de Biologia Molecular e Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- NOLETO, G. R.; MERCE, A. L.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A.; SOCCOL, V. T.; OLIVEIRA, M. B. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol Cell Biochem**. v. 233, n. 1-2, p. 73-83, 2002.

NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; NOSEDA, M. D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, n. 5, p. 749-757, 2009.

OHYA, Y.; OUE, H.; NAGATOMI, K.; OUCHI, T. Design of macromolecular prodrug of cisplatin using dextran with branched galactose units as targeting moieties to hepatoma cells. **Biomacromolecules**. v. 2, n. 3, p. 927-933, 2001.

ONISHI, H.; MORISAKI, T.; NAKAO, F.; ODATE, S.; MORISAKI, T.; KATANO, M. Protein-bound polysaccharide decreases invasiveness and proliferation in pancreatic cancer by inhibition of hedgehog signaling and HIF-1 $\alpha$  pathways under hypoxia. **Cancer Letters**. v. 335, n. 2, p. 289-298, 2013.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M.-R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**. v. 60, n. 3, p. 201-208, 2003.

PARK, H. S.; KIM, G.-Y.; NAM, T.-J.; DEUK KIM, N.; HYUN CHOI, Y. Antiproliferative Activity of Fucoidan Was Associated with the Induction of Apoptosis and Autophagy in AGS Human Gastric Cancer Cells. **Journal of Food Science**. v. 76, n. 3, p. T77-T83, 2011.

PARKS, S. K.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy **Nature Reviews Cancer**. v. 13, n. p. 611-623, 2013a.

PARKS, S. K.; CORMERAIS, Y.; MARCHIQ, I.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 47-48, n. p. 3-14, 2016.

PARKS, S. K.; MAZURE, N. M.; COUNILLON, L.; POUYSSEGUR, J. Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. **Journal of Cellular Physiology** v. 228, n. p. 1854–1862, 2013b.

PATRA, K. C.; HAY, N. The pentose phosphate pathway and cancer. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 39, n. 8, p. 347-354, 2014.

PAULSEN, B. S. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. **Current Organic Chemistry**. v. 5, n. p. 939-950, 2001.

PAULSEN, B. S. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. **Phytochemistry Reviews**. v. 1, n. p. 379–387, 2002.

PAVLOVA, NATALYA N.; THOMPSON, CRAIG B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**. v. 23, n. 1, p. 27-47, 2016.

PAYEN, V. L.; PORPORATO, P. E.; BASELET, B.; SONVEAUX, P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 73, n. 7, p. 1333-1348, 2016.

PELICANO, H.; FENG, L.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; HILEMAN, E. O.; PLUNKETT, W.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Inhibition of Mitochondrial Respiration: A NOVEL STRATEGY TO ENHANCE DRUG-INDUCED APOPTOSIS IN HUMAN LEUKEMIA CELLS BY A REACTIVE OXYGEN SPECIES-MEDIATED MECHANISM. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 39, p. 37832-37839, 2003.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; XU, R. H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**. v. 25, n. 34, p. 4633-4646, 2006.

PERELMAN, A.; WACHTEL, C.; COHEN, M.; HAUPT, S.; SHAPIRO, H.; TZUR, A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**. v. 3, n. 11, p. e430, 2012.

PESSOA, J. C.; ETCHEVERRY, S.; GAMBINO, D. Vanadium compounds in medicine. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 301–302, n. p. 24-48, 2015.

PETERSZEGI, G.; ISNARD, N.; ROBERT, A. M.; ROBERT, L. Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose-rich oligo- and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 57, n. p. 187–194, 2003.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 44, n. 2, p. 107-112, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, n. 4, p. 659-664, 2007.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M.-R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of caesalpinaceae. **Phytochemistry**. v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

POUYSSÉGUR, J.; FRANCHI, A.; SALOMON, J. C.; SILVESTRE, P. Isolation of a Chinese hamster fibroblast mutant defective in hexose transport and aerobic glycolysis: its use to dissect the malignant phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 77, n. 5, p. 2698-2701, 1980a.

POUYSSÉGUR, J.; FRANCHI, A.; SILVESTRE, P. Relationship between increased aerobic glycolysis and DNA synthesis initiation studied using glycolytic mutant fibroblasts. **Nature**. v. 287, n. 5781, p. 445-447, 1980b.

PRIGENT-RICHARD, S.; CANSELL, M.; VASSY, J.; VIRON, A.; PUVION, E.; JOZEFONVICZ, J.; LETOURNEUR, D. Fluorescent and radiolabeling of polysaccharides: binding and internalization experiments on vascular cells. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 40, n. 2, p. 75-81, 1998.

PUSAPATI, R. V.; DAEMEN, A.; WILSON, C.; SANDOVAL, W.; GAO, M.; HALEY, B.; BAUDY, A. R.; HATZIVASSILIOU, G.; EVANGELISTA, M.; SETTLEMAN, J. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. **Cancer Cell**. v. 29, n. 4, p. 548-562, 2016.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydrate Polymers**. v. 45, n. 1, p. 69-77, 2001.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers**. v. 50, n. 1, p. 79-83, 2002.

RAMOS-MONTOYA, A.; LEE, W.-N. P.; BASSILIAN, S.; LIM, S.; TREBUKHINA, R. V.; KAZHYNA, M. V.; CIUDAD, C. J.; NOÉ, V.; CENTELLES, J. J.; CASCANTE, M. Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. **International Journal of Cancer**. v. 119, n. 12, p. 2733-2741, 2006.



RAY, R. S.; RANA, B.; SWAMI, B.; VENU, V.; CHATTERJEE, M. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. **Chemico-Biological Interactions**. v. 163, n. 3, p. 239-247, 2006.

REHDER, D. Perspectives for vanadium in health issues. **Future Med. Chem.** v. 8, n. 3, p. 325 - 338, 2016.

REHDER, D. Implications of vanadium in technical applications and pharmaceutical issues. **Inorganica Chimica Acta**. v. 455, Part 2, n. p. 378-389, 2017.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**. v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RICHARD, D. E.; BERRA, E.; GOTHIE, E.; ROUX, D.; POUYSSEUR, J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia- inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. **J Biol Chem**. v. 274, n. p. 1999.

RIGANTI, C.; GAZZANO, E.; POLIMENI, M.; ALDIERI, E.; GHIGO, D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53, n. 3, p. 421-436, 2012.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S. B.; MORRIS, E. R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydrate Research**. v. 107, n. 1, p. 17-32, 1982.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**. v. 32, n. 7, p. 955-963, 2011.

SABHARWAL, S. S.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? **Nature Reviews Cancer**. v. 14, n. 11, p. 709-721, 2014.

SAKURAI, H.; YASUI, H.; ADACHI, Y. The therapeutic potential of insulin-mimetic vanadium complexes. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. v. 12, n. 7, p. 1189-1203, 2003.

SALABEL, J. K.; GIBB, A. A.; HILL, B. G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. **Nat. Protocols**. v. 9, n. 2, p. 421-438, 2014.

SANTANDER, S. P.; AOKI, M.; HERNANDEZ, J. F.; POMBO, M.; MOINS-TEISSERENC, H.; MOONEY, N.; FIORENTINO, S. Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. **International Immunopharmacology**. v. 11, n. 6, p. 652-660, 2011.

SAROSIEK, K. A.; FRASER, C.; MUTHALAGU, N.; BHOLA, P. D.; CHANG, W.; MCBRAYER, S. K.; CANTLON, A.; FISCH, S.; GOLOMB-MELLO, G.; RYAN, J. A.; DENG, J.; JIAN, B.; CORBETT, C.; GOLDENBERG, M.; MADSEN, J. R.; LIAO, R.; WALSH, D.; SEDIVY, J.; MURPHY, D. J.; CARRASCO, D. R.; ROBINSON, S.; MOSLEHI, J.; LETAI, A. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. **Cancer Cell**. v. 31, n. 1, p. 142-156, 2017.

SCATENA, R.; BOTTONI, P.; PONTOGLIO, A.; MASTROTOTARO, L.; GIARDINA, B. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. **Expert Opin. Investig. Drugs** v. 17, n. 10, p. 1533 - 1545, 2008.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.

SCHULZE, A.; HARRIS, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. **Nature**. v. 491, n. 7424, p. 364-373, 2012.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. **Current Opinion in Cell Biology** v. 13, n. p. 167 - 171 2001.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway. **Science's STKE**. v. 2007, n. 407, p. cm8-cm8, 2007.

SEMENZA, G. L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. **Seminars in Cancer Biology** v. 19, n. p. 12 - 16, 2009.

SEMENZA, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **J Clin Invest**. v. 123, n. 9, p. 3664-3671, 2013.

SHEN, W.; GUAN, Y.; WANG, J.; HU, Y.; TAN, Q.; SONG, X.; JIN, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y. A polysaccharide from pumpkin induces apoptosis of HepG2 cells by activation of mitochondrial pathway. **Tumor Biology**. v. 37, n. 4, p. 5239-5245, 2016.

SHI, X.; ZHAO, Y.; JIAO, Y.; SHI, T.; YANG, X. ROS-Dependent Mitochondria Molecular Mechanisms Underlying Antitumor Activity of Pleurotus abalonus Acidic Polysaccharides in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. **PLoS ONE**. v. 8, n. 5, p. e64266, 2013.

SIBIKINA, O. V.; IOZEP, A. A.; MOSKVIN, A. V. Polysaccharide complexes with metal cations: structure and application (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**. v. 43, n. 6, p. 341-345, 2009.

SILVEIRA, J. D. C. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES E CITOTÓXICOS DE POLISSACARÍDEOS DE *Chorisia speciosa* E *Hymenaea courbaril*. Mestrado em Ciências-Bioquímica Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Setor de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**. v. 59, n. 3, p. 339-350, 2005.

ŚLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAŁ, T.; ŁYŻWA, P.; KIEŁBASIŃSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZYK, Z. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. **PLoS ONE**. v. 11, n. 5, p. e0155772, 2016.

SMITH II, T. S.; LOBRUTTO, R.; PECORARO, V. L. Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 228, n. 1, p. 1-18, 2002.

SOLAINI, G.; SGARBI, G.; BARACCA, A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. v. 1807, n. 6, p. 534-542, 2011.

SOM, P.; ATKINS, H. L.; BANDOYPADHYAY, D.; FOWLER, J. S.; MACGREGOR, A. R.; MATSUI, K.; OSTER, Z. H.; SACKER, D. F.; SHLUE, C. Y.; TURNER, H.; WAN, C. N.; WOLF, A. P.; ZABINSKI, S. V. A Fluorinated Glucose Analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): Nontoxic Tracer for Rapid Tumor Detection. **Journal of Nuclear Medicine**. v. 21, n. p. 670 - 675, 1980.

- SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E. C.; SOMBRA, V. G.; SOARES, P. M. G.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**. v. 152, n. p. 140-148, 2016.
- SPUGNINI, E.; FAIS, S. Proton pump inhibition and cancer therapeutics: A specific tumor targeting or it is a phenomenon secondary to a systemic buffering? **Seminars in Cancer Biology**. v. 42, n. p. *in press*, 2017.
- SRIVASTAVA, A. K.; MEHDI, M. Z. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabet Med**. v. 22, n. p. 2005.
- SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed Galactomannans: An Overview. **Chemistry & Biodiversity**. v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.
- STOLTZMAN, C. A.; KAADIGE, M. R.; PETERSON, C. W.; AYER, D. E. MondoA senses non-glucose sugars: regulation of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and the hexose transport curb. **J Biol Chem**. v. 286, n. 44, p. 38027-38034, 2011.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**. v. 458, n. 7239, p. 719-724, 2009.
- STRIANESE, M.; BASILE, A.; MAZZONE, A.; MORELLO, S.; TURCO, M. C.; PELLECCIA, C. Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 228, n. 11, p. 2202-2209, 2013.
- SUI, X.; CHEN, R.; WANG, Z.; HUANG, Z.; KONG, N.; ZHANG, M.; HAN, W.; LOU, F.; YANG, J.; ZHANG, Q.; WANG, X.; HE, C.; PAN, H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death & Disease**. v. 4, n. 10, p. e838, 2013.
- SUN, Y.; PENG, Z.-L. Programmed cell death and cancer. **Postgraduate Medical Journal**. v. 85, n. 1001, p. 134-140, 2009.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondrial Regulation of Cell Death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 5, n. 9, p. 2013.
- TAIT, S. W. G.; ICHIM, G.; GREEN, D. R. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. **Journal of Cell Science**. v. 127, n. 10, p. 2135-2144, 2014.
- TAKESHIGE, K.; BABA, M.; TSUBOI, S.; NODA, T. ; OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **Journal of Cell Biology**. v. 119, n. p. 301 - 311 1992.
- TENG, H.; YANG, Y.; WEI, H.; LIU, Z.; LIU, Z.; MA, Y.; GAO, Z.; HOU, L.; ZOU, X. Fucoidan Suppresses Hypoxia-Induced Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Mouse Hepatocarcinoma. **Marine Drugs**. v. 13, n. 6, p. 3514, 2015.
- TENNANT, D. A.; DURÁN, R. V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 10, n. 4, p. 267-277, 2010.
- THOMPSON, K. H.; BÖHMERLE, K.; POLISHCHUK, E.; MARTINS, C.; TOLEIKIS, P.; TSE, J.; YUEN, V.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. Complementary inhibition of synoviocyte, smooth muscle cell or mouse lymphoma cell proliferation by a vanadyl curcumin complex compared to curcumin alone. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 98, n. 12, p. 2063-2070, 2004.

THOMPSON, K. H.; LICHTER, J.; LEBEL, C.; SCAIFE, M. C.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, n. 4, p. 554-558, 2009.

THOMPSON, K. H.; MCNEILL, J. H.; ORVIG, C. Vanadium compounds as insulin mimics. **Chem Rev**. v. 99, n. p. 1999.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 100, n. 12, p. 1925-1935, 2006.

TISCHER, C. A.; OLIVEIRA, M. B. M.; REICHER, F.; IACOMINI, M.; PETKOWICZ, C. L. O.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; GORIN, P. A. J. Complexation of vanadium(V) oxyanions with hexopyranose- and mannopyranoseuronic acid-containing polysaccharides: stereochemical considerations. **Carbohydrate Research**. v. 339, n. 4, p. 771-775, 2004.

TOM, B. H.; RUTZKY, L. P.; JAKSTYS, M. M.; OYASU, R.; KAYE, C. I.; KAHAN, B. D. Human colonic adenocarcinoma cells. **In Vitro**. v. 12, n. 3, p. 180-191, 1976.

TSARAMYRSI, M.; KALIVA, M.; SALIFOGLU, A.; RAPTOPOULOU, C. P.; TERZIS, A.; TANGOULIS, V.; GIAPINTZAKIS, J. Vanadium(IV)–Citrate Complex Interconversions in Aqueous Solutions. A pH-Dependent Synthetic, Structural, Spectroscopic, and Magnetic Study. **Inorganic Chemistry**. v. 40, n. 23, p. 5772-5779, 2001.

TSUTSUMI, S.; HOGAN, V.; NABI, I. R.; RAZ, A. Overexpression of the Autocrine Motility Factor/Phosphoglucose Isomerase Induces Transformation and Survival of NIH-3T3 Fibroblasts. **Cancer Research**. v. 63, n. 1, p. 242-249, 2003.

ULLREY, D. B.; FRANCHI, A.; POUYSSEGUR, J.; KALCKAR, H. M. Down-regulation of the hexose transport system: metabolic basis studied with a fibroblast mutant lacking phosphoglucose isomerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 79, n. 12, p. 3777-3779, 1982.

USTYUZHANINA, N. E.; BILAN, M. I.; GERBST, A. G.; USHAKOVA, N. A.; TSVETKOVA, E. A.; DMITRENOK, A. S.; USOV, A. I.; NIFANTIEV, N. E. Anticoagulant and antithrombotic activities of modified xylofucan sulfate from the brown alga *Punctaria plantaginea*. **Carbohydrate Polymers**. v. 136, n. p. 826-833, 2016.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**. v. 160, n. p. 1 - 40 2006.

VAN NOORDEN, R.; LEDFORD, H. Medical award for cell recycling. **Nature** v. 538, n. p. 18–19, 2016.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nat Rev Drug Discov**. v. 10, n. 9, p. 671-684, 2011.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009a.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**. v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009b.

VERCESI, A. E.; BERNARDES, C. F.; HOFFMANN, M. E.; GADELHA, F. R.; DOCAMPO, R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the

mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. **Journal of Biological Chemistry**. v. 266, n. 22, p. 14431-14434, 1991.

WAMELINK, M. M. C.; STRUYS, E. A.; JAKOBS, C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 31, n. 6, p. 703-717, 2008.

WANG, G. L.; JIANG, B. H.; RUE, E. A.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 92, n. 12, p. 5510-5514, 1995.

WANG, Q.; LIU, T.-T.; FU, Y.; WANG, K.; YANG, X.-G. Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**. v. 15, n. 7, p. 1087-1097, 2010.

WARBURG, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. **The Journal of Cancer Research**. v. 9, n. 1, p. 148-163, 1925.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**. v. 124, n. 3215, p. 269-270, 1956a.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**. v. 124, n. p. 1956b.

WEINBERG, F.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial Metabolism and Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1177, n. 1, p. 66-73, 2009.

WEINBERG, S. E.; CHANDEL, N. S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. **Nat Chem Biol**. v. 11, n. 1, p. 9-15, 2015.

WHITE, E. The role for autophagy in cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 125, n. 1, p. 42-46, 2015.

WILLSKY, G. R.; HALVORSEN, K.; GODZALA III, M. E.; CHI, L.-H.; MOST, M. J.; KASZYNSKI, P.; CRANS, D. C.; GOLDFINE, A. B.; KOSTYNIK, P. J. Coordination chemistry may explain pharmacokinetics and clinical response of vanadyl sulfate in type 2 diabetic patients. **Metallomics**. v. 5, n. 11, p. 1491, 2013.

WILSON, S. A.; WEBER, J. H. An EPR study of the reduction of vanadium(V) to vanadium(IV) by fulvic acid. **Chemical Geology**. v. 26, n. 3, p. 345-354, 1979.

WILSON, W. R.; HAY, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 11, n. 6, p. 393-410, 2011.

WOJCIECH DABROS, A. U. A. K. Comparison of bipyridyl, maltol and kojic acid action as organic vanadium ligands on activity of galactosyltransferase (EC 2.4.1.38), some physiological parameters and ultrastructure of Golgi complexes in rat hepatocytes. **Folia Histochem Cytobiol**. v. 45, n. 3, p. 239-244-239-244, 2007.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in carbohydrate chemistry**. v. 2, n. p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in carbohydrate chemistry**. v. 2, n. p. 65-68, 1963b.

- WU, H.-M.; JIANG, Z.-F.; DING, P.-S.; SHAO, L.-J.; LIU, R.-Y. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. **Scientific Reports**. v. 5, n. p. 12291, 2015.
- WU, Y.; MA, Y.; XU, Z.; WANG, D.; ZHAO, B.; PAN, H.; WANG, J.; XU, D.; ZHAO, X.; PAN, S.; LIU, L.; DAI, W.; JIANG, H. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. **Cancer Letters**. v. 351, n. 1, p. 108-116, 2014.
- XIE, J.-H.; LIU, X.; SHEN, M.-Y.; NIE, S.-P.; ZHANG, H.; LI, C.; GONG, D.-M.; XIE, M.-Y. Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. **Food Chemistry**. v. 136, n. 3-4, p. 1453-1460, 2013.
- XU, R.-H.; PELICANO, H.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; FENG, L.; BHALLA, K. N.; KEATING, M. J.; HUANG, P. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. **Cancer Research**. v. 65, n. 2, p. 613-621, 2005.
- YANG, H.; TIAN, S.-T.; WU, R.-Y.; CHEN, Y.; MEI, Z.-N.; WANG, C.-Y.; YANG, G.-Z. Glycoborinine induces apoptosis through mitochondrial pathway in HepG2 cells. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 16, n. 10, p. 991-999, 2014.
- YANG, X. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 237, n. 1-2, p. 103-111, 2003.
- YANG, Y.; KARAKHANOVA, S.; WERNER, J.; BAZHIN, A. V. Reactive Oxygen Species in Cancer Biology and Anticancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**. v. 20, n. 30, p. 3677-3692, 2013.
- YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**. v. 111, n. 2, p. 428-432, 2008.
- YIN, P. H.; LEE, H. C.; CHAU, G. Y.; WU, Y. T.; LI, S. H.; LUI, W. Y.; WEI, Y. H.; LIU, T. Y.; CHI, C. W. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. **Br J Cancer**. v. 90, n. 12, p. 2390-2396, 2004.
- YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**. v. 27, n. 50, p. 6398-6406, 2008.
- YOON, S.-J.; CHU, D.-C.; RAJ JUNEJA, L. Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolyzed Guar Gum as Dietary Fiber. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 42, n. 1, p. 1-7, 2008.
- YOSHINAGA, M.; UEKI, T.; YAMAGUCHI, N.; KAMINO, K.; MICHIBATA, H. Glutathione transferases with vanadium-binding activity isolated from the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1760, n. 3, p. 495-503, 2006.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 9, n. 1, p. 47-59, 2008.
- YU, X.-H.; LIU, Y.; WU, X.-L.; LIU, L.-Z.; FU, W.; SONG, D.-D. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng. **Carbohydrate Polymers**. v. 156, n. p. 9-18, 2017.

YU, X.; LI, S. Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis. **Oncogene**. v. 36, n. 19, p. 2629-2636, 2017.

ZEPEDA, A. B.; PESSOA, A.; CASTILLO, R. L.; FIGUEROA, C. A.; PULGAR, V. M.; FARIAS, J. G. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. **Cell Biochem Funct**. v. 31, n. p. 2013.

ZHANG, Y. L.; WANG, X. S.; FANG, W.; CAI, X. Y.; LI, H. Z.; MAO, J. W.; JIN, X. B.; BAI, Y. L.; LU, J. Z. In vitro study of the cytotoxicities of two mixed-ligand oxovanadium complexes on human hepatoma cells. **Pharmazie**. v. 68, n. 10, p. 827-834, 2013.

ZHAO, C.; GAO, L.; WANG, C.; LIU, B.; JIN, Y.; XING, Z. Structural characterization and antiviral activity of a novel heteropolysaccharide isolated from *Grifola frondosa* against enterovirus 71. **Carbohydrate Polymers**. v. 144, n. p. 382-389, 2016.

ZHAO, Y.; YE, L.; LIU, H.; XIA, Q.; ZHANG, Y.; YANG, X.; WANG, K. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 104, n. 4, p. 371-378, 2010.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012.

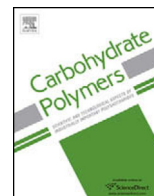
ZONG, W.-X.; RABINOWITZ, JOSHUA D.; WHITE, E. Mitochondria and Cancer. **Molecular Cell**. v. 61, n. 5, p. 667-676, 2016.

ZOU, Y.; XIONG, H.; XIONG, H.; LU, T.; ZHU, F.; LUO, Z.; YUAN, X.; WANG, Y. A polysaccharide from *Andrographis paniculata* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatoma cell line (HepG2). **Tumor Biology**. v. 36, n. 7, p. 5179-5186, 2015.

ZU, X. L.; GUPPY, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 313, n. 3, p. 459-465, 2004.

# ANEXOS





# Toxicity of native and oxovanadium (IV/V) galactomannan complexes on HepG2 cells is related to impairment of mitochondrial functions



Monique Meyenberg Cunha - de Padua<sup>a</sup>, Silvia Maria Suter Correia Cadena<sup>a</sup>,  
Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz<sup>a</sup>, Glaucia Regina Martinez<sup>a</sup>,  
Maria Eliane Merlin Rocha<sup>a</sup>, Ana Lucia Ramalho Mercê<sup>b</sup>,  
Guilhermina Rodrigues Noleto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 March 2017

Received in revised form 31 May 2017

Accepted 5 June 2017

Available online 7 June 2017

### Keywords:

Galactomannans  
Oxovanadium  
HepG2 cells  
Cytotoxic effects  
Antitumor

## ABSTRACT

Polysaccharides and vanadium compounds have been studied due to their antitumor potential. In this study, the cytotoxic effects of galactomannan preparations on HepG2 cells were investigated. Native galactomannan from *S. amazonicum* (SAGM) and its modified form (MSAGM) were complexed with oxovanadium resulting in SAGM:VO and MSAGM:VO, respectively. The complexation was confirmed by NMR, FTIR, and AAS. SAGM and MSAGM:VO (250 µg/mL) after 72 h decreased viability by 51% and 58%, respectively, while the inhibition of the HepG2 cell proliferation was of ~27% and ~46%, respectively. SAGM and MSAGM:VO (250 µg/mL) significantly inhibited all states of respiration (basal: 85% and 63%; uncoupled: 90% and 70%; and leak: 30% and 58%) after 72 h. ROS levels increased by ~149% after the treatment with MSAGM:VO (250 µg/mL) for 72 h, while  $\Delta\Psi_m$  decreased by ~50%. Our results indicate that galactomannan preparations from *S. amazonicum*, especially SAGM and the MSAGM:VO complex, could be considered as potential antitumor drugs for further investigations, once they have the ability to make HepG2 cells susceptible to death by affecting vital cellular processes such as respiration and ROS generation.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most aggressive cancers and the third most common cause of cancer-related death worldwide (Buendia & Neuvet, 2015). Treatments, such as chemotherapy and radiotherapy, are rarely effective and promote unbearable side effects. New therapies based on targeting the metabolism of cancer cells are a promising option since tumor cells have a specific metabolic phenotype (Fulda, Galluzzi, & Kroemer, 2010).

Over the years, polysaccharides have appeared as an important class of bioactive compounds due to their diversified biological effects, such as anticancer activity (Zong, Cao, & Wang, 2012). Their activities may be also changed by chemical modification, including partial hydrolysis as well as the removal or introduction of

specific groups (Noleto et al., 2009). Several complexes of polysaccharides with metals have been investigated in order to evaluate their biological activities (Gyurcsik & Nagy, 2000). Complexes with galactomannans isolated from *Ramalina celastri* lichen are noteworthy for their immunomodulatory effects (Noleto et al., 2002). Leishmanicidal activity (Adriazola et al., 2014; Amaral et al., 2015) and cytotoxic effects on HeLa cells (Noleto et al., 2009) have also been observed.

Vanadium possesses six oxidation states, being vanadyl (IV) and vanadate (V) the most important ones from a biological standpoint (Bishayee, Waghay, Patel, & Chatterjee, 2010). Due to its ability to form coordination complexes with several organic ligands, the biological activity of vanadium and its complexes has been widely investigated (Kremer, McLeod, Aitken, Levina, & Lay, 2015; Liu, Liu, & Yi, 2015). It has been proposed that the complexation of metals with organic ligands improves their biodistribution and decreases their toxicity (Kremer et al., 2015; Willsky et al., 2013). Regarding antitumor activity, some studies have shown that certain vanadium compounds inhibit DNA and RNA synthesis (Evangelou, 2002), increase reactive species of oxygen (ROS) (Wang Liu, Fu,

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [guinoleto@yahoo.com.br](mailto:guinoleto@yahoo.com.br), [guilherminanoleto@ufpr.br](mailto:guilherminanoleto@ufpr.br) (G.R. Noleto).

Wang, & Yang, 2010), promote cell cycle arrest in the G2/M phase (Strianese et al., 2013) and cell death by apoptosis (Wu et al., 2014).

The cytotoxic effects of polysaccharides on tumor cells are closely related with their chemical structure (Meng, Liang, & Luo, 2016; You et al., 2013; Zong et al., 2012). In this sense, we have shown that galactomannans preparations from *M. scabrella* seeds, as well as their complexes with oxovanadium are cytotoxic to HeLa cells (Noleto et al., 2009), and galactomannan from *S. amazonicum* (Fig. 1) is cytotoxic to HepG2 cells (Cunha - de Padua, Suter Correia Cadena, de Oliveira Petkowicz, Martinez, & Rodrigues Noleto, 2017). Now, we hypothesize that galactomannan preparations from *S. amazonicum* seeds and their complexes with oxovanadium could promote cytotoxic effects on HepG2 cells due to impairment of certain metabolic functions. In addition, we also postulate that chemical modification by hydrolysis of native galactomannans would improve their complexation properties with vanadium, as well as their cytotoxic effects. The results would contribute for clarifying the antitumor (cytotoxic) mechanisms of these polysaccharides.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and materials

Vanadyl sulphate ( $\text{VOSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), crystal violet, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), rotenone, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), oligomycin, trypsin-EDTA, gentamicin, dimethyl sulfoxide (DMSO), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and dialysis tubing were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ) was supplied by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). JC-1 cyanine dye (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) was obtained from Molecular probes®. Tissue culture materials were provided by Corning or Nunc. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FSB) were supplied by Cultilab (Brazil).

### 2.2. Extraction and partial hydrolysis of galactomannans from *S. amazonicum*

The storage galactomannan was isolated by aqueous extraction from the endosperm of *S. amazonicum* seeds according to the procedure described by Petkowicz, Reicher, Chanzy, Taravel, and Vuong (2001). The polysaccharide originated, called SAGM (*Schizolobium amazonicum* Galactomannan), was centrifuged and the supernatant was precipitated with ethanol three times and dried in a vacuum oven ( $25^\circ\text{C}$ ). SAGM was subjected to partial acid hydrolysis with 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  for 1 h at  $100^\circ\text{C}$ . The material was neutralized with  $\text{BaCO}_3$ , precipitated with ethanol, centrifuged, dialyzed (3 days) with a membrane (10 kDa), and lyophilized. The polymer obtained was named MSAGM (Modified *Schizolobium amazonicum* Galactomannan).

### 2.3. Characterization of galactomannans from *S. amazonicum*

#### 2.3.1. Monosaccharide composition

The polysaccharide was hydrolyzed with 2 M TFA for 5 h at  $100^\circ\text{C}$  (Adams, 1965), evaporated to dryness. After resuspension in water (5 mL), the monosaccharides were reduced with  $\text{NaBH}_4$  (5 mg) for 16 h (Wolf from & Thompson, 1963b). Alditols were treated with cation exchange resin and the solution was then filtered. The filtrate was evaporated to dryness. Methanol was added and evaporated to dryness (repeated three times). The dry

alditols were acetylated with  $\text{Ac}_2\text{O}$ -pyridine (1:1, v/v) for 16 h at  $25^\circ\text{C}$  (Wolf from & Thompson, 1963a, 1963b). Alditol acetates were extracted with chloroform (1 mL) and analyzed by gas-liquid chromatography using a 5890 A II HP gas chromatograph at  $220^\circ\text{C}$  (flame ionization detector and injector temperature of  $250^\circ\text{C}$ ) with a DB-210 capillary column (0.25 mm i.d  $\times$  30 m), film thickness of 0.25  $\mu\text{m}$ , and  $\text{N}_2$  (2.0 mL/min) as the carrier gas.

#### 2.3.2. High-performance size-exclusion chromatography

The high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) apparatus used was a Waters unit coupled to a refractive index (RI) and a Wyatt Technology Dawn F multiangle laser light scattering (MALLS) detector. Four Waters Ultrahydrogel columns (2000, 500, 250, and 120) were connected in series and coupled to the multi-detection instrument. A solution of 0.1 M  $\text{NaNO}_2$  with 0.02%  $\text{NaN}_3$  was used as an eluent at a flow of 0.6 mL/min.

The refractive index increment of the solvent-solute solution regarding a change in solute concentration ( $dn/dc$ ) was determined and used to calculate the average molar mass ( $M_w$ ) using a Wyatt Technology ASTRA software.

#### 2.3.3. Nuclear magnetic resonance spectroscopy – $^{13}\text{C}$ NMR

$^{13}\text{C}$  NMR analysis of all samples were recorded at  $70^\circ\text{C}$  with a Bruker DRX 400 spectrometer at 75 MHz after dissolving the fractions (10–15 mg) with  $\text{D}_2\text{O}$  using acetone as an internal standard. Chemical shifts are expressed relative to acetone ( $\delta$  30.2).

### 2.4. Preparation of galactomannan oxovanadium complexes

#### 2.4.1. Potentiometric titrations

The  $\text{VO}^{2+/3+}$  (represented as VO for simplicity) aqueous solution in 0.1 M  $\text{HNO}_3$  and potentiometric titration were performed according to Noleto et al. (2009). Briefly, SAGM and MSAGM 0.2 mmol and taken to the titration vessels in the absence and in the presence of VO solutions, using a 2:1 ligand-(SAGM or MSAGM) to-metal (L:M) ratio. The stability constants were calculated using the software Hyperquad (Gans, Sabatini, & Vacca, 1996). The protonation constant of the polymer employed is reported elsewhere (Noleto et al., 2009). The hydrolysis constants for VO was taken from the literature (Mesmer & Baes, 1976). The experiments were performed in triplicate.

#### 2.4.2. Characterization of the galactomannan complexes

According the potentiometric data, SAGM and MSAGM complexes at a 2:1 ligand-to-metal ratio were obtained by dissolving 0.3 g (2.5 mmol) of the galactomannans in water (160 mL) and later mixing with 0.1 M VO (12.5 mL, 1.25 mmol). The mixture was titrated by adding 0.1 M and 0.01 M KOH pH 7.8, dialyzed against ultrapure water (three changes per day) for 72 h, and lyophilized. The material obtained was analyzed using  $^{51}\text{V}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance and infrared spectrophotometry. The polymers obtained after complexation were named SAGM:VO (*Schizolobium amazonicum* Galactomannan oxovanadium) and MSAGM:VO (Modified *Schizolobium amazonicum* Galactomannan oxovanadium). To determine the vanadium concentration, ~25 mg of lyophilized complexes were dissolved in 0.1 M  $\text{HNO}_3$  (4 mL) and atomic absorption spectroscopy was used (SpectrAA model 220FS, India).

#### 2.4.3. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

For  $^{51}\text{V}$  NMR analysis, the samples were prepared by dissolving 30 mg of polysaccharide-oxovanadium complexes in 0.8 mL of either 0.1 M KOD to reach pH 7.8.  $^{51}\text{V}$  NMR analysis was carried out using a Bruker DXR-400 Advance spectrometer with a 5 mm inverse probe.  $^{51}\text{V}$  NMR spectra were obtained at 105.15 MHz with 0.5 s D1 and 0.1 s AQ, at  $30^\circ\text{C}$ . Chemical shifts were expressed in

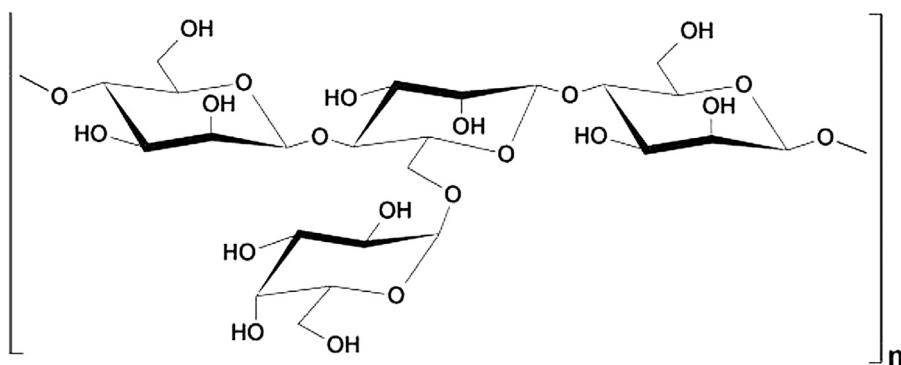


Fig. 1. Proposed structure of galactomannan from *Schizolobium amazonicum* of average 3.0:1 Man:Gal Ratio.

$\delta$  (ppm) relative to that of the external standard  $\text{VOCl}_3$  ( $\delta = 0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR analyses of complexes were done as mentioned before.

#### 2.4.4. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

The derivatives were investigated by FT-IR (BOMEM MB-100 – Hartman & Braun, Canada). The samples (2 mg) were previously dried, ground with potassium bromide at a ratio of 1:100, and pressed into pellets, which were used for FT-IR analysis in the frequency range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5. Effects of galactomannan preparations on HepG2 cells

#### 2.5.1. Galactomannan preparation

Galactomannan solutions were prepared in ultrapure water at a concentration of 5 mg/mL. Subsequently, the solution was sterilized by filtration through 0.22  $\mu\text{m}$  membrane, kept at  $-20^\circ\text{C}$ , and then diluted in culture medium for the experiments.

#### 2.5.2. Maintenance of HepG2 cells

HepG2 cells were acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. The cells were maintained in DMEM high-glucose medium supplemented with 10% FBS, 50  $\mu\text{g/mL}$  gentamycin, 20 mmol/L HEPES, adjusted to pH 7.4 with sodium bicarbonate. HepG2 cells were grown in poly-L-lysine-coated flasks at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  under controlled humidity.

#### 2.5.3. Cell viability assay

HepG2 cells were trypsinized and seeded ( $10^4$  cells/well) in 96-well plates. After 24 h of adhesion, the culture medium was removed and biopolymers at 50, 100, and 250  $\mu\text{g/mL}$  diluted in culture medium were added, followed by incubation as described. After 24, 48, and 72 h, the cell viability was determined using the MTT method (Mosmann, 1983). In other protocol, the cells were pre-incubated with 10 mM *N*-acetyl-cysteine (NAC) for 2 h before the addition of MSAGM:VO (100 and 250  $\mu\text{g/mL}$ ). Cell viability was done after 72 h by MTT assay.

#### 2.5.4. Cell proliferation assay

Cell proliferation was evaluated by crystal violet staining (Kueng, Silber, & Eppenberger, 1989). HepG2 cells were seeded ( $10^4$  cells/well) in 96-well culture plates. After 24 h, solution of biopolymers at 50, 100, and 250  $\mu\text{g/mL}$  were added, followed by incubation for 24, 48, and 72 h, as described. The supernatant was removed and the cells were processed according Noleto et al. (2009).

#### 2.5.5. Measurement of cell respiration

Oxygen consumption was monitored by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k, Oroboros® Instruments, Innsbruck, Austria) (Gnaiger, 2001) in HepG2 cells treated with 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$  with biopolymers for 72 h. Oxygen consumption was

Table 1

Binding constants of SAGM and MSAGM (L) with VO.

Log K	SAGM:VO	MSAGM:VO
$[\text{LVO}]/[\text{L}][\text{VO}]$	$14.26 \pm 0.03$	$14.54 \pm 0.03$
$[\text{LVOH}]/[\text{LVO}][\text{H}]$	$17.16 \pm 0.06$	$17.83 \pm 0.05$
$[\text{LOHVO}]/[\text{LVO}][\text{OH}]$	$7.36 \pm 0.06$	$6.92 \pm 0.09$
$[\text{L}(\text{VO})_2(\text{OH})_2]/[\text{L}][\text{VO}]^2[\text{OH}]^2$	$11.22 \pm 0.03$	$11.58 \pm 0.04$
$[\text{L}_2(\text{OH})_2(\text{VO})_2]/[\text{L}]^2[\text{OH}]^2[\text{VO}]^2$	n.d.	$17.91 \pm 0.06$

n.d. = not detected; L = SAGM or MSAGM.

rated in different states of respiration: Basal, oxygen consumption in the absence of inhibitors and uncouplers; leak respiration, in the presence of oligomycin (2  $\mu\text{g/mL}$ ); which represents the respiration that is not coupled to ATP synthesis; and uncoupled, oxygen consumption in the presence of the uncoupler FCCP (0.5  $\mu\text{M}$ ), which corresponds to the maximal respiratory capacity to restore the dissipated proton gradient. Oxygen flow in these states was corrected by subtraction from non-mitochondrial respiration, which was obtained after addition of rotenone (0.5  $\mu\text{M}$ ) and antimycin (3  $\mu\text{g/mL}$ ). Results are expressed as oxygen flow per cell ( $\text{pmol}/(\text{s} \times 5 \times 10^5 \text{ cells})$ ) as mean  $\pm$  SD.

#### 2.5.6. Measurement of lactate and pyruvate production

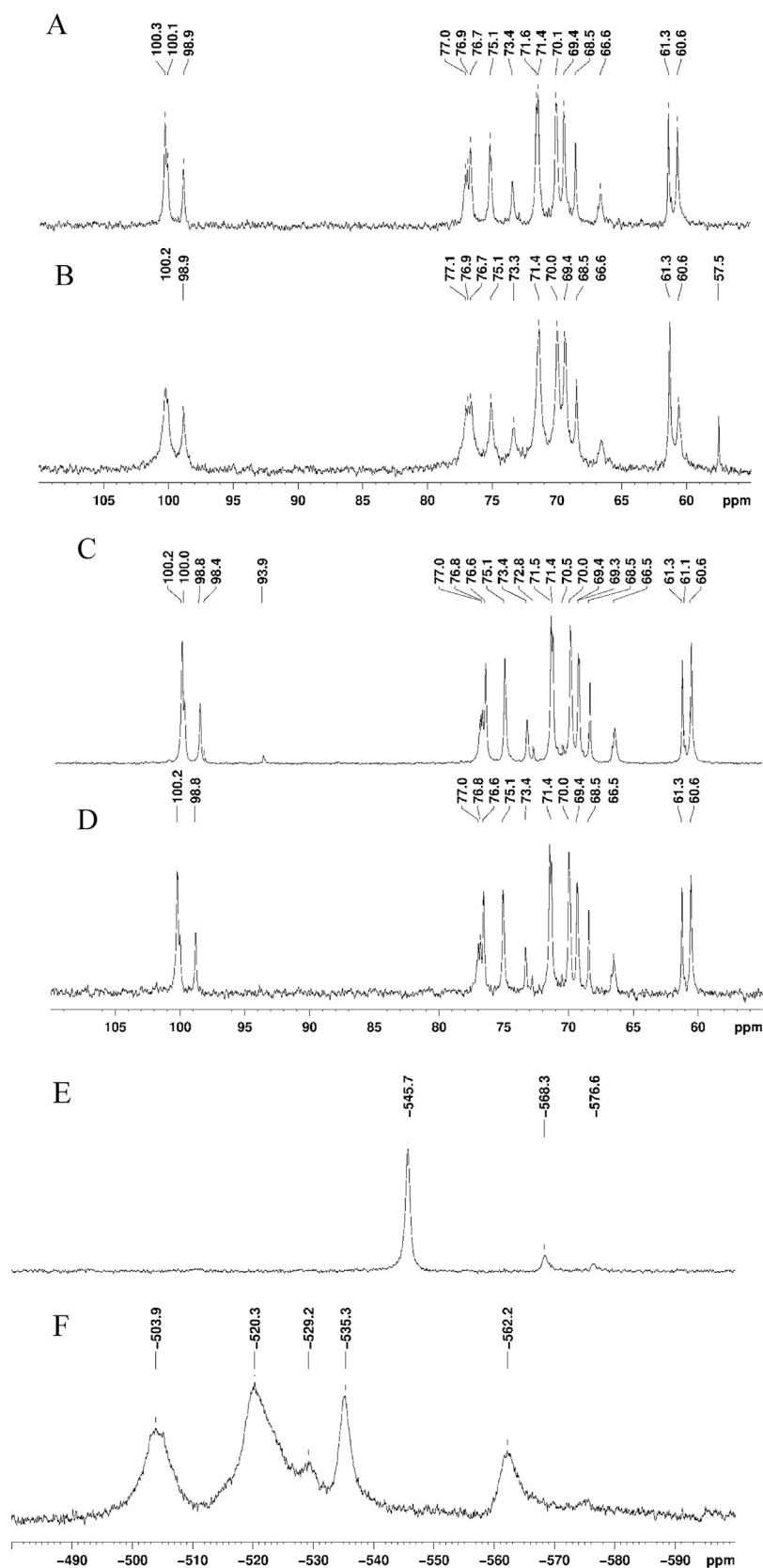
In the supernatant from HepG2 cultures treated with 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$  of biopolymers were determined lactate and pyruvate levels according to Gutmann and Wahlefeld (1974) and Czoc and Lamprecht (1974), respectively. The amount of lactate and pyruvate was calculated from the molar extinction coefficient of NADH ( $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 2.5.7. Detection of intracellular ROS levels

HepG2 cells ( $1 \times 10^4$ /well) were seeded in 96-optic-well plates and incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. The medium was removed and fresh medium containing 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$  of biopolymers was added and incubated for 72 h in the same conditions. After that, the cells were washed with PBS and incubated with DCFDA (5  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in the dark to measure  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kalyanaraman et al., 2012). DCFDA was detected using a microplate reader (Infinite 200 TECAN) at excitation and emission of 488 and 525 nm, respectively. 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  was used as a positive control 2 h before the measurement. MTT assay standardization was performed after each experiment.

#### 2.5.8. Measurement of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ )

JC-1 cyanine dye was used to perform this experiment (Perelman et al., 2012). HepG2 cells ( $1 \times 10^5$ /well) were seeded in 6-well plates in duplicate per treatment. After 24 h, the cells were treated with 100 and 250  $\mu\text{g/mL}$  of biopolymers and the measurement of  $\Delta\psi_m$  was performed 72 h later. Cells were washed with



**Fig. 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of galactomannans preparations: (A) SAGM, (B) SAGM:VO, (C) MSAGM, and (D) MSAGM:VO.  $^{51}\text{V}$  NMR spectra of galactomannan oxovanadium complexes: (E) SAGM:VO and (F) MSAGM:VO.

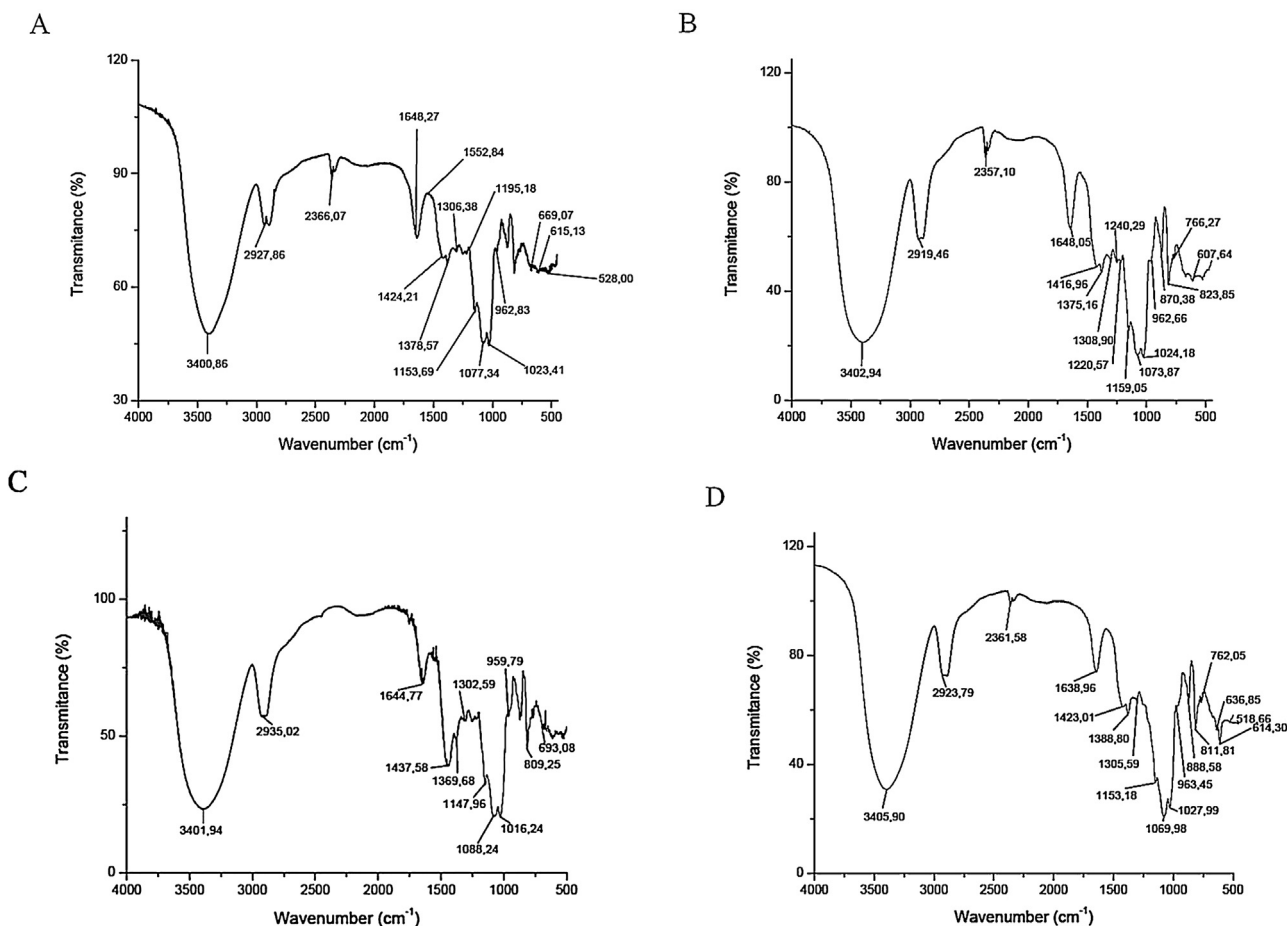


Fig. 3. Analysis of FTIR. FTIR spectra of (A) SAGM, (B) SAGM:VO, (C) MSAGM, and (D) MSAGM:VO.

PBS, trypsinized, centrifuged (3 min, 4 °C, 200g) and incubated with JC-1 (5  $\mu$ M) in the dark for 15 min at 37 °C. JC-1 was detected with a 488 nm excitation laser of a flow cytometer (BD Accuri™ C6). Valinomycin (1  $\mu$ M) was used as a positive control 30 min before the measurement.

## 2.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison of means.  $p < 0.05$  was considered significant. All analyses and graphs were performed using GraphPad Prism Software version 6.0.

## 3. Results

### 3.1. Preparation and characterization of galactomannans and their complexes

After monosaccharide composition analysis, a 3.2:1 Man:Gal ratio was obtained, which is in agreement with previous reports for galactomannans from the same species isolated under similar conditions (Bento et al., 2013; Ganter et al., 1995; Petkowicz et al., 2001; Petkowicz, Schaefer, & Reicher, 2007). SAGM was subjected to partial acid hydrolysis resulting in a MSAGM fraction, which showed the same Man:Gal ratio as the native polymer.

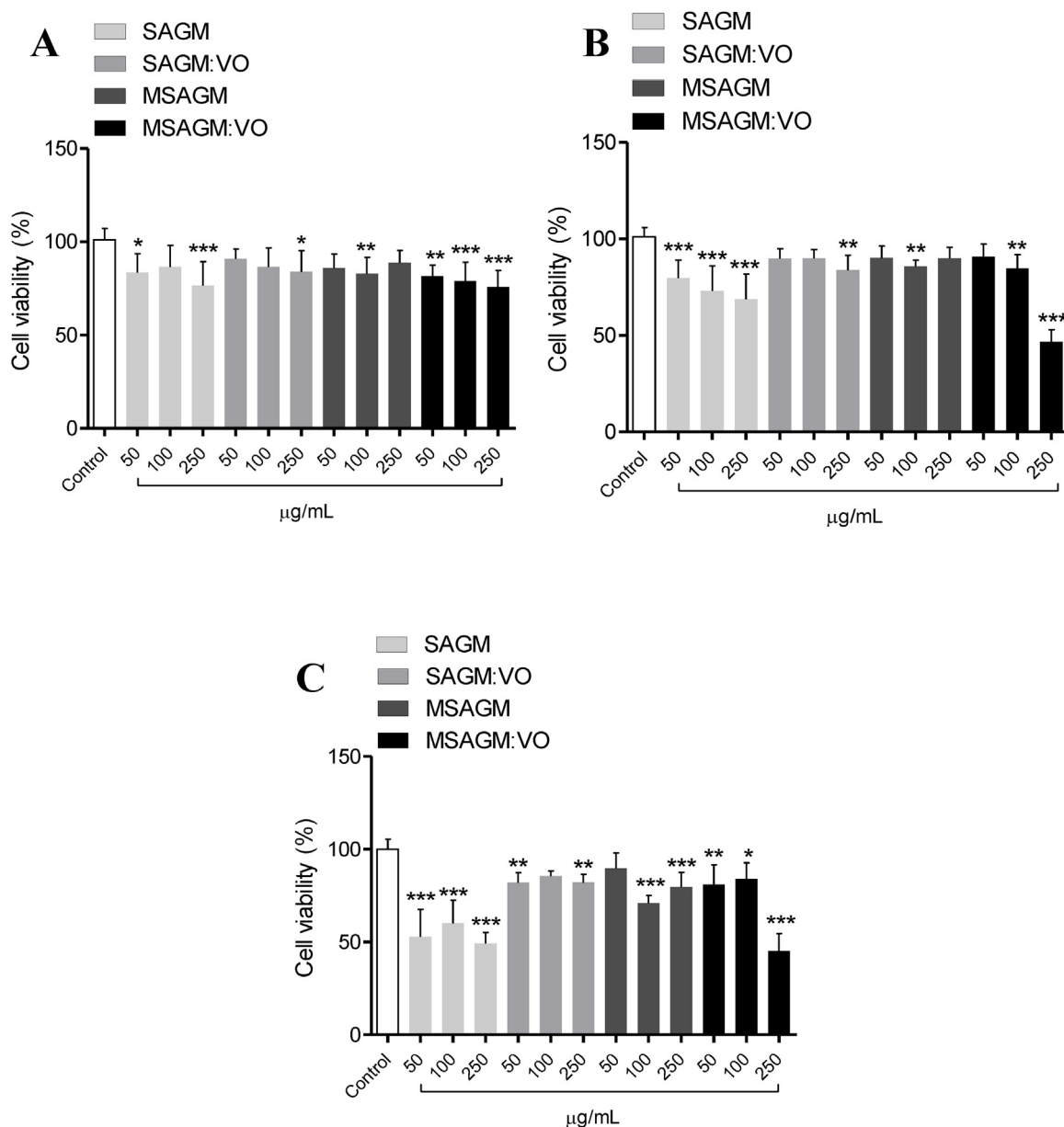
The <sup>13</sup>C NMR spectrum (Fig. 2A) showed signals typical of galactomannan composed of a backbone of D-manopyranoses units linked by  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) glycosidic bonds with lateral branches of

D-galactopyranoses linked by  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) glycosidic bonds (Table S1). All assignments were based on literature values (Buckeridge & Dietrich, 1996; Petkowicz, Sierakowski, Ganter, & Reicher, 1998). For MSAGM, an additional signal was observed in the anomeric region at  $\delta$  93.9 (Fig. 2C). The galactomannans showed monomodal elution profiles by HPSEC (Fig. S1). The chromatogram of MSAGM was shifted to higher elution time compared to SAGM due to the acid treatment resulting in lower molar mass. For SAGM and MSAGM, the molar mass was  $4.34 \times 10^5$  g/mol and  $1.56 \times 10^4$  g/mol, respectively.

The simulation and experimental curves for the potentiometric titration profiles of SAGM and MSAGM in the presence of VO at a 2:1 ligand-to-metal ratio were in concordance (Fig. S2A). These data were used to calculate the stability constants for the complexes SAGM:VO and MSAGM:VO (Table 1). The equilibria studied considered percentages above 10% and metal ion concentration at 100%. The stability constant values for the main species detected were similar for both complexed polysaccharides, except for  $L_2(OH)_2(VO)_2$  species, which was observed only for partially hydrolyzed galactomannan.

<sup>13</sup>C NMR analysis confirmed the complexation for SAGM since differences were detected in the spectrum of complexed and uncomplexed polymers (Fig. 2A and B). In the spectrum of SAGM:VO (Fig. 1B), signals appear broader and the intensity of the signal related to C - 6 ( $\delta$  60.6 ppm) of non-substituted manopyranose units was reduced. An additional signal at  $\delta$  57.5 ppm was also found in the SAGM:VO spectrum. No differences were found between the spectra of MSAGM and MSAGM:VO (Fig. 2C and D).





**Fig. 4.** Cell Viability of HepG2 cells treated with galactomannan preparations. (A) 24 h; (B) 48 h and (C) 72 h. Values represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*, \*\* and \*\*\* denote values significantly different from the control at  $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively.

SAGM:VO and MSAGM:VO were investigated by  $^{51}\text{V}$  NMR (Fig. 2E and F). SAGM:VO  $^{51}\text{V}$  NMR spectrum showed signals at  $\delta$  -545.7, -568.3, and -576.6 ppm, which are indicative of three different species of oxovanadium complexes. The MSAGM:VO spectrum exhibited different signals at  $\delta$  -501.4, -518.0, -527.1, -533.1, and -560.4 ppm, indicating the existence of five species of complexes.

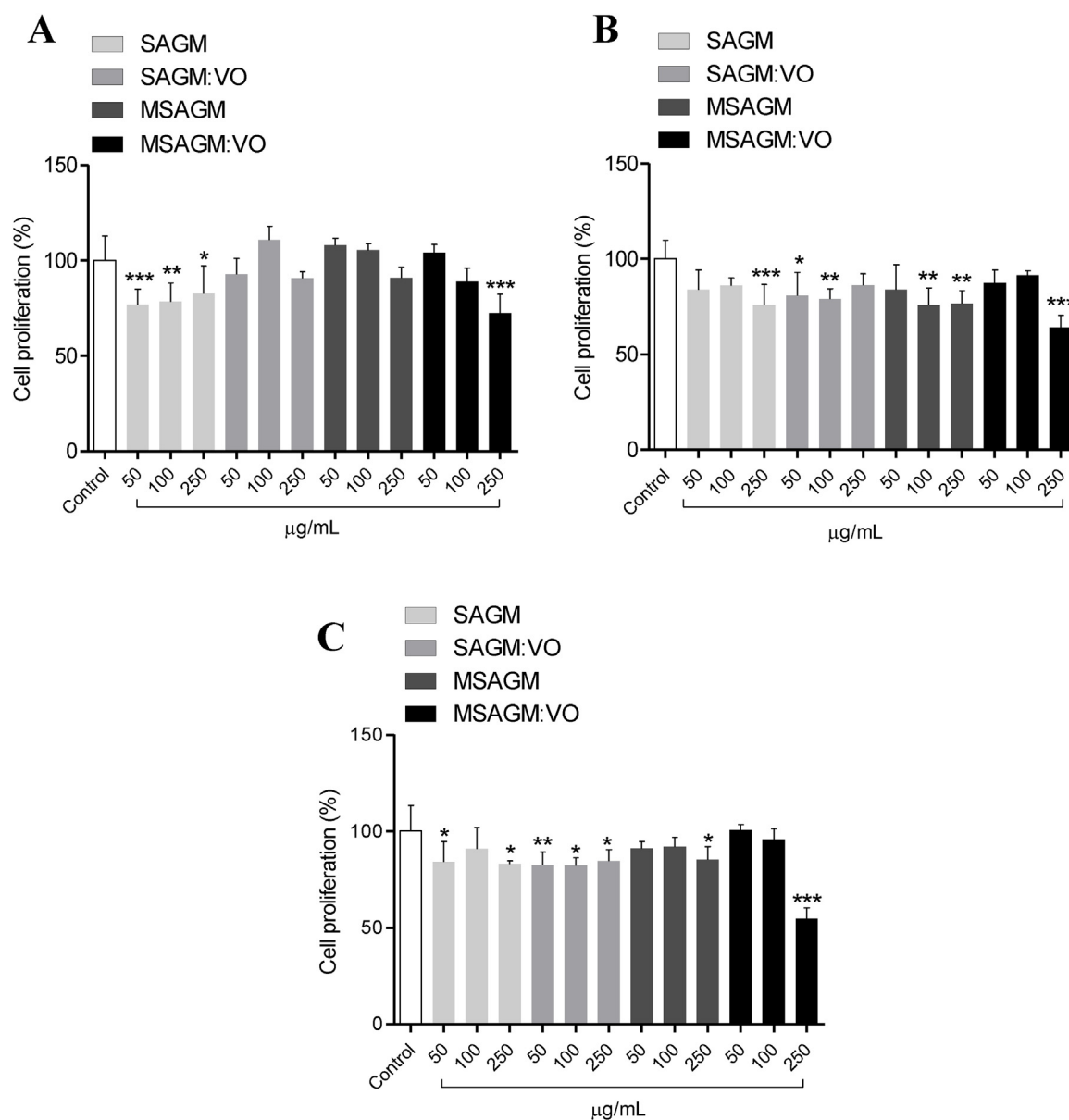
The FTIR spectra of SAGM and SAGM:VO did not show differences (Fig. 3A and B). On the other hand, MSAGM and MSAGM:VO spectra showed differences between the bands concerning C-H, C-H<sub>2</sub>, and C-OH. MSAGM (Fig. 3C) showed a weak absorption at wavelength 1088  $\text{cm}^{-1}$  while MSAGM:VO (Fig. 3D) showed a strong signal at 1069  $\text{cm}^{-1}$ . Those differences could be explained by metal complexation with oxygen atoms (C-OH) showing deformations in these bond types, confirming the complexation of oxovanadium ions (HO-C<sub>6</sub>). Additionally, a significant difference occurred in the bands of 1437  $\text{cm}^{-1}$  for MSAGM and 1423  $\text{cm}^{-1}$  for MSAGM:VO, which showed a strong and weak signal, respectively. The changes

in the region of 1100–750  $\text{cm}^{-1}$  in the spectrum of the complexes could also be due to the VO stretching vibration (Noletto et al., 2009). Vanadium contents of 0.38% and 0.095% were detected by atomic absorption spectroscopy for SAGM:VO and MSAGM:VO complexes, respectively.

### 3.2. Effects of galactomannans on HepG2 cell viability and proliferation

After 24 h (Fig. 4A), biopolymers SAGM and MSAGM:VO at 250  $\mu\text{g/mL}$  decreased cell viability by  $\sim 24\%$ . At the same concentration for 48 h, SAGM and MSAGM:VO decreased cell viability by  $\sim 34$  and  $\sim 54\%$ , respectively (Fig. 4B) and after 72 h (Fig. 4C), SAGM and MSAGM:VO decreased cell viability by  $\sim 51$  and  $\sim 58\%$ , respectively.

The effects of SAGM and MSAGM:VO on cell proliferation were most pronounced after 72 h and for the highest concentration (Fig. 5). SAGM and MSAGM:VO decreased HepG2 proliferation by  $\sim 27\%$  and  $\sim 46\%$ , respectively.



**Fig. 5.** Cell Proliferation of HepG2 cells treated with galactomannan preparations. (A) 24 h; (B) 48 h and (C) 72 h. Values represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*, \*\* and \*\*\* denote values significantly different from the control at  $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively.

### 3.3. Effect of galactomannans on HepG2 cell respiration

Oxygen uptake is represented in Fig. 6(A), where the solid line represents oxygen concentration ( $\mu\text{M}$ ) and the dashed line represents oxygen flow ( $\text{pmol}/(\text{s} \times 5 \times 10^5 \text{ cells})$ ). The basal state was monitored in the absence of inhibitors or uncouplers. Oxygen uptake in the presence of oligomycin results from the re-entry of protons into the mitochondrial matrix, characterizing the leak state. The addition of uncoupler FCCP promotes a significant increase in respiration, named uncoupled state. Finally, mitochondrial respiration was completely inhibited by the addition of rotenone and antimycin (inhibited state).

Respiration results after 72 h of treatment with biopolymers were analyzed by the DataLab4<sup>®</sup> software and are shown in Fig. 6(B–D). As depicted in Fig. 6(B), SAGM inhibited basal respiration by 85% (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), while its complexed form (SAGM:VO) slightly inhibited this state by  $\sim 22\%$ . The MSAGM exhibited a

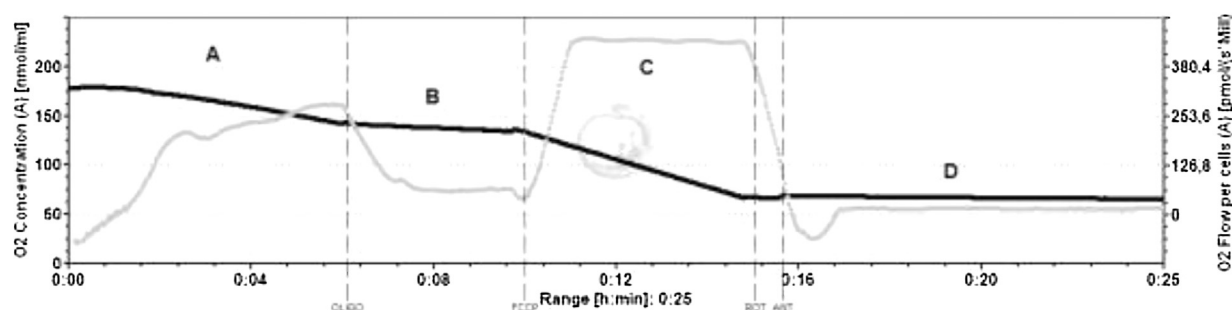
similar profile as the SAGM:VO complex, whereas its complexed counterpart MSAGM:VO decreased basal respiration by  $\sim 63\%$ .

Galactomannans preparations (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) decreased respiration at the leak state by  $\sim 30\%$  (Fig. 6C), except for MSAGM:VO, which was able to decrease oxygen consumption by  $\sim 58\%$ . The biopolymers also promoted a significant inhibition of the uncoupled state (Fig. 6D) by around 50% for SAGM:VO, MSAGM, and MSAGM:VO. In agreement with the results of respiration in the basal state, SAGM was able to inhibit the uncoupled state by  $\sim 90\%$  while MSAGM:VO decreased respiration in the presence of FCCP by  $\sim 70\%$ .

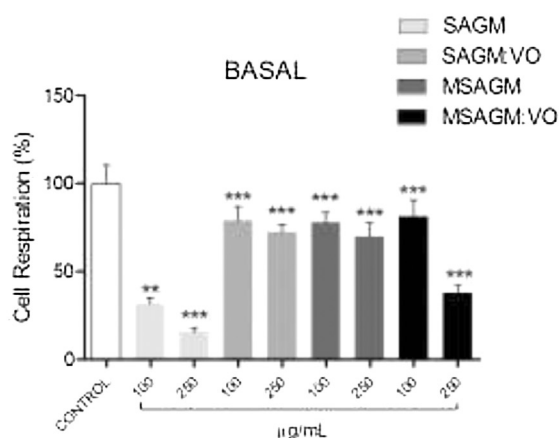
### 3.4. Effects of galactomannans on lactate and pyruvate levels

As shown in Fig. 7(A), SAGM at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  increased lactate levels by  $\sim 25\%$ . However, SAGM:VO (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MSAGM (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and MSAGM:VO (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) decreased lactate levels by 19, 21, and 10%, respectively. Regarding pyruvate levels (Fig. 7B),

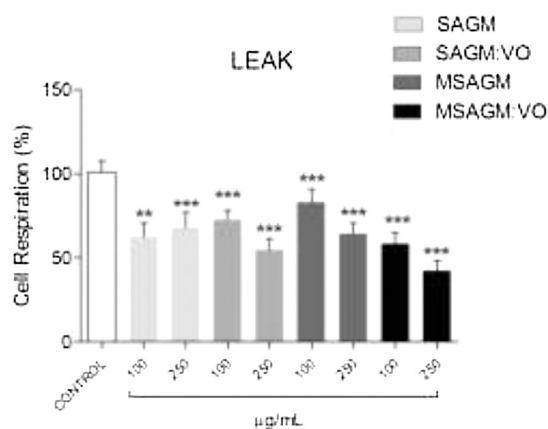
A



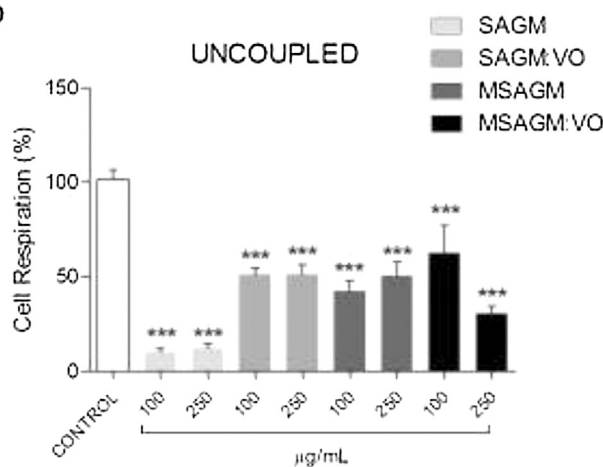
B



C



D



**Fig. 6.** Cell Respiration of HepG2 cells. (A) Representative traces of HepG2 cell respiration. Legends: A) Basal state; B) Leak state; C) Uncoupled state; D) Inhibited state; oligo – oligomycin; ROT – rotenone; ANT – antimycin A. Solid line: oxygen concentration; Dashed line: oxygen flow. The oxygen consumption was determined in the absence of inhibitors or uncouplers (B), in the presence of oligomycin (C), and in the presence of FCCP (D). The values represent the mean  $\pm$  the standard error of six different experiments. \*, \*\*, and \*\*\* denote values significantly different from the control at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.0001$ , respectively.

the biopolymers did not promote significant changes in comparison to the control.

### 3.5. Effects of galactomannans on mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

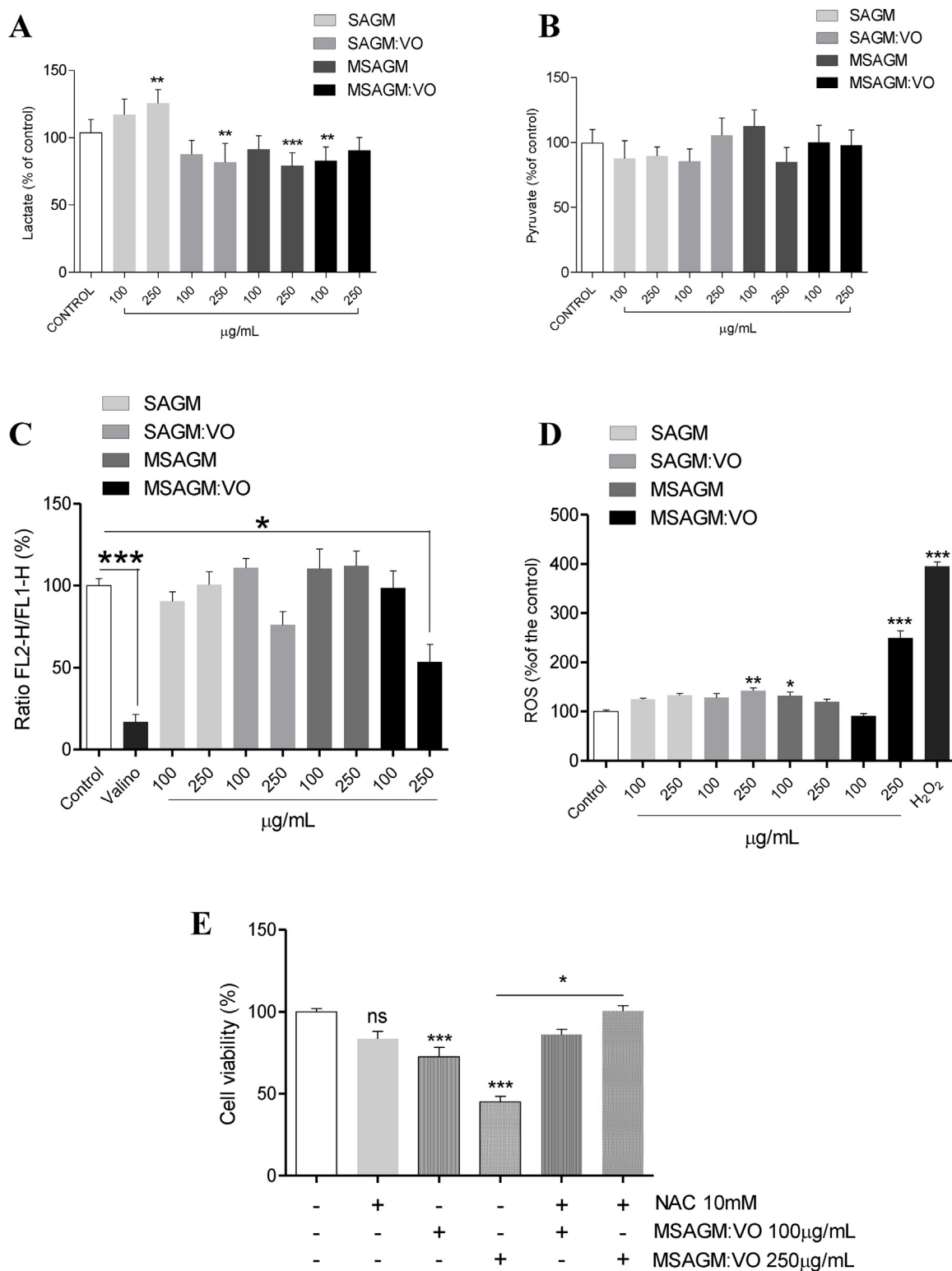
The  $\Delta\Psi_m$  in the HepG2 cells was monitored after 72 h with biopolymers (Fig. 7C). Valinomycin (1 mM) was used to collapse  $\Delta\Psi_m$  and, as expected, the reduction in  $\Delta\Psi_m$  was by 86% com-

pared with the control. MSAGM:VO (250  $\mu\text{g/mL}$ ) was able to affect  $\Delta\Psi_m$ , reducing it by  $\sim 50\%$ .

### 3.6. Effects of galactomannans in intracellular ROS levels

In respect the ROS levels MSAGM:VO was the most effective, increasing ROS levels by  $\sim 149\%$  in comparison to the control (Fig. 7D). The pre-treatment of cells with NAC, an antioxidant able to prevent oxidative stress, is widely used to suggest the involvement of ROS production in the decrease of cell viability (Cusimano





**Fig. 7.** Effect of galactomannan preparations on HepG2 cells in: (A) Levels of lactate and (B) pyruvate in the supernatant of HepG2 cells; (C)  $\Delta\Psi_m$  where, ratio of FL2-H/FL1-H means: ratio of depolarized/energized mitochondria; (D) ROS levels and (E) cell viability in absence or presence of NAC with MSAGM:VO. The mean  $\pm$  SD is representative of three independent experiments carried out in duplicate and triplicate \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

et al., 2015; Halasi et al., 2013). Fig. 7(E) shows that pre-treatment of HepG2 cells with NAC prevented intracellular ROS production mediated by MSAGM:VO, increasing cell viability by 55%, thus becoming equivalent to control cells.

#### 4. Discussion

In the present study, galactomannan from seeds of *S. amaronicum* and its partially hydrolyzed form were characterized, complexed with oxovanadium (IV/V), and the effects of all preparations on HepG2 cell were investigated.

The partial acid hydrolysis in galactomannan (MSAGM) was performed in order to evaluate the effect of reducing molar mass on the ability of metal complexation. The analysis of complexation indicates that both galactomannan preparations showed similar profile in relation to the number of complexed species, except for MSAGM:VO, for which an additional species was detected. However, SAGM:VO showed four-fold more vanadium than MSAGM:VO. Considering that hydrolysis and complexation procedures modify the 3D structure of a biopolymer, it is possible that important binding sites in native galactomannan were destroyed, impairing the vanadium complexation. According to these results, the native biopolymer is more prone to binding oxovanadium than its hydrolyzed form. Stable oxovanadium complexes were also obtained for a galactomannan from lichen (Amaral et al., 2015; Noleto et al., 2002), galactomannans from seeds (Noleto et al., 2009), and xyloglucans (Amaral et al., 2015).

Our results indicate different profiles of cytotoxicity for native, hydrolyzed, and complexed preparations of the biopolymers. MSAGM:VO and SAGM appear to be more cytotoxic than SAGM:VO and MSAGM at the same concentration, as indicated by viability and cell proliferation analysis. Galactomannans from *M. scabrella* (GALMAN-A) and its hydrolyzed form (GALMAN-B), both complexed with oxovanadium inhibited the proliferation on HeLa cells (Noleto et al., 2009). The authors suggest that the presence of metal is important for the cytotoxic effects.

In the present study, our results also show that the partially hydrolyzed polymer complexed with oxovanadium (MSAGM:VO) is more cytotoxic to HepG2 cells than its uncomplexed form. In contrast, the native form (SAGM) was more cytotoxic than the SAGM:VO complex concerning cell viability, but showed a similar profile in cell proliferation. These results indicate that the effects of galactomannan preparations from *S. amazonicum* on HepG2 cells can be related to structural aspects of the polymers in addition to the presence of metal.

All biopolymers inhibited HepG2 cells respiration after 72 h of treatment, being SAGM and MSAGM:VO the most effective ones. SAGM (250 µg/mL) promoted a slight increase in lactate levels, suggesting an activation of anaerobic glycolysis in response to the inhibition of respiration. On the other hand, the SAGM:VO, MSAGM, and MSAGM:VO treatments decreased lactate levels, suggesting impairment of the anaerobic glycolysis to provide ATP for cell survival. Decreases in lactate levels in ATP-dependent cells caused by aerobic glycolysis (Warburg effect) are the target of investigation aiming at antitumor drugs (Marchiq, Le Floch, Roux, Simon, & Pouyssegur, 2014; Martinez-Outschoorn, Peiris-Pagés, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2017).

In spite of the significant inhibition of respiration by SAGM,  $\Delta\Psi_m$  was not changed by the polymer treatment. On the other hand, MSAGM:VO showed a reduction in  $\Delta\Psi_m$  by ~50% and this effect is in concordance with some studies using other vanadium compounds and polysaccharides. Wu et al. (2014) showed that sodium orthovanadate promoted a collapse of mitochondrial membrane potential and an increase in the apoptosis rate on HepG2 cells. Strianese et al. (2013) demonstrated that oxovanadium complexes with derivatives of pyridoxine also decreased  $\Delta\Psi_m$  in human melanoma and lung cancer cells. Recently, Cui et al. (2016) showed that polysaccharides from *P. nebrodensis* (PNA-2) reduced the  $\Delta\Psi_m$  on HepG2 cells and polysaccharides from *A. paniculata* (APWP) also decreased the  $\Delta\Psi_m$  on HepG2 (Zou et al., 2015).

In the present study, we observed an increase in ROS levels that corroborates a loss of  $\Delta\Psi_m$  when HepG2 cells were treated with MSAGM:VO. It is possible that these effects on mitochondria are responsible for the cytotoxicity induced by the MSAGM:VO complex since the increase in ROS level and loss of  $\Delta\Psi_m$  are involved in cell death (Gottlieb, Armour, Harris, & Thompson, 2003; Sabharwal & Schumacker, 2014). The involvement of ROS production in the

effects induced by MSAGM:VO is corroborated with measurements of viability of HepG2 cells pre-treated with NAC (Zafarullah, Li, Sylvester, & Ahmad, 2003). The prevention of loss of cell viability by NAC suggests that the polymer inhibited the growth of HepG2 cells through an ROS-dependent pathway. The cytotoxic effects induced by SAGM and MSAGM:VO on HepG2 cells seem to occur through different pathways. In addition, we suggest that the presence of vanadium is essential to promote ROS production, since SAGM:VO, although in lower intensity than MSAGM:VO, also increased ROS levels in the HepG2 cells.

## 5. Conclusion

The results of present work did not confirm our initial hypothesis since the partial hydrolysis of galactomannan did not improve its binding ability to oxovanadium, as expect. However, the modified biopolymer complexed with vanadium (MSAGM:VO) was the most cytotoxic on HepG2 cells, inhibiting cells respiration, decreasing the  $\Delta\Psi_m$  and increasing ROS levels. Although at different intensities, all galactomannan preparations also impaired the HepG2 respiration. Therefore, we show by the first time that the cytotoxic effects of galactomannan oxovanadium complexes on human hepatocarcinoma cells (HepG2) are related to the impairment of certain metabolic functions and point to the therapeutic potential of these polymers for the treatment of hepatocellular carcinoma.

## Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian research funding agencies CNPq (472651/2012-9) and CAPES. G.R.M. was also supported by INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma. LACAUTest performed the atomic absorption analyses.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.027>.

## References

- Adams, G. A. (1965). Complete acid hydrolysis. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 269–280.
- Adriazola, I. O., Amaral, A. E. d., Amorim, J. C., Correia, B. L., Petkowicz, C. L. O., Mercê, A. L. R., & Noleto, G. R. (2014). Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex in vitro. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 132, 45–51.
- Amaral, A. E. d., Petkowicz, C. L. O., Mercê, A. L. R., Iacomini, M., Martinez, G. R., Merlin Rocha, M. E., ... & Noleto, G. R. (2015). Leishmanicidal activity of polysaccharides and their oxovanadium(IV/V) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90, 732–741.
- Bishayee, A., Waghay, A., Patel, M. A., & Chatterjee, M. (2010). Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. *Cancer Letters*, 294(1), 1–12.
- Buckeridge, M. S., & Dietrich, S. M. C. (1996). Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science*, 117(1–2), 33–43.
- Buendia, M. A., & Neuveut, C. (2015). Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(2), 1–11.
- Cui, H., Wu, S., Sun, Y., Wang, T., Li, Z., Chen, M., & Wang, C. (2016). Polysaccharide from *Pleurotus nebrodensis* induces apoptosis via a mitochondrial pathway in HepG2 cells. *Food Function*, 7(1), 455–463.
- Cunha - de Padua, M. M., Suter Correia Cadena, S. M., de Oliveira Petkowicz, C. L., Martinez, G. R., & Rodrigues Noleto, G. (2017). Galactomannan from *Schizolobium amazonicum* seed and its sulfated derivatives impair metabolism in HepG2 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 464–473.
- Cusimano, A., Puleio, R., D'Alessandro, N., Loria, G. R., McCubrey, J. A., Montalto, G., & Cervello, M. (2015). Cytotoxic activity of the novel small molecule AKT inhibitor SC66 in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(3), 1707–1722.
- Czac, R., & Lamprecht, W. (1974). Pyruvate, phosphoenolpyruvate and d-glycerate-2-phosphate. *Methods in Enzymatic Analysis*, 3, 1446–1451.
- Evangelou, A. M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42, 249–265.

- Fulda, S., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(6), 447–464.
- Gans, P., Sabatini, A., & Vacca, A. (1996). Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*, 43(10), 1739–1753.
- Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: Dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*, 128(3), 277–297.
- Gottlieb, E., Armour, S., Harris, M., & Thompson, C. (2003). Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 10(6), 709–717.
- Gutmann, I., & Wahlefeld, A. (1974). L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, 1464–1468.
- Gyurcsik, B., & Nagy, L. (2000). Carbohydrates as ligands: Coordination equilibria and structure of the metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 203(1), 81–149.
- Halasi, M., Wang, M., Chavan Tanmay, S., Gaponenko, V., Hay, N., & Gartel Andrei, L. (2013). ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. *Biochemical Journal*, 454(2), 201–208.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(1), 1–6.
- Kremer, L. E., McLeod, A. I., Aitken, J. B., Levina, A., & Lay, P. A. (2015). Vanadium(V) and -(IV) complexes of anionic polysaccharides: Controlled release pharmaceutical formulations and models of vanadium biotransformation products. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 147, 227–234.
- Kueng, W., Silber, E., & Eppenberger, U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, 182(1), 16–19.
- Liu, S., Liu, G., & Yi, Y. (2015). Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: Synthesis, characterization, and biological activities. *Carbohydrate Polymers*, 121, 86–91.
- Marchiq, I., Le Floch, R., Roux, D., Simon, M. P., & Pouyssegur, J. (2014). Genetic disruption of lactate/H<sup>+</sup> symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Research*, 75(1), 171–180.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: A therapeutic perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14, 11–31.
- Meng, X., Liang, H., & Luo, L. (2016). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 424, 30–41.
- Mesmer, R., & Baes, C. (1976). *The hydrolysis of cations*. New York: Wiley.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Noletto, G. R., Merce, A. L., Iacomini, M., Gorin, P. A., Soccol, V. T., & Oliveira, M. B. (2002). Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 233(1–2), 73–83.
- Noletto, G. R., Petkowicz, C. L. O., Mercê, A. L. R., Nosedá, M. D., Méndez-Sánchez, S. C., Reicher, F., & Oliveira, M. B. M. (2009). Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(5), 749–757.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, 3(11), e430.
- Petkowicz, C. L. O., Sierakowski, M.-R., Ganter, J. L. M. S., & Reicher, F. (1998). Galactomannans and arabinans from seeds of caesalpinaceae. *Phytochemistry*, 49(3), 737–743.
- Petkowicz, C. L. O., Reicher, F., Chanzy, H., Taravel, F. R., & Vuong, R. (2001). Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydrate Polymers*, 44(2), 107–112.
- Petkowicz, C. L. O., Schaefer, S., & Reicher, F. (2007). The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 69(4), 659–664.
- Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709–721.
- Strianese, M., Basile, A., Mazzone, A., Morello, S., Turco, M. C., & Pellicchia, C. (2013). Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(11), 2202–2209.
- Wang, Q., Liu, T.-T., Fu, Y., Wang, K., & Yang, X.-G. (2010). Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(7), 1087–1097.
- Willsky, G. R., Halvorsen, K., Godzala Iii, M. E., Chi, L.-H., Most, M. J., Kaszynski, P., ... & Kostyniak, P. J. (2013). Coordination chemistry may explain pharmacokinetics and clinical response of vanadyl sulfate in type 2 diabetic patients. *Metallomics*, 5(11), 1491.
- Wolf from, M. L., & Thompson, A. (1963a). Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211–215.
- Wolf from, M. L., & Thompson, A. (1963b). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65–68.
- Wu, Y., Ma, Y., Xu, Z., Wang, D., Zhao, B., Pan, H., & Jiang, H. (2014). Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Letters*, 351(1), 108–116.
- You, L., Gao, Q., Feng, M., Yang, B., Ren, J., Gu, L., & Zhao, M. (2013). Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumor activities. *Food Chemistry*, 138(4), 2242–2249.
- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J., & Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(1), 6–20.
- Zong, A., Cao, H., & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1395–1410.
- Zou, Y., Xiong, H., Xiong, H., Lu, T., Zhu, F., Luo, Z., & Wang, Y. (2015). A polysaccharide from *Andrographis paniculata* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatoma cell line (HepG2). *Tumor Biology*, 36(7), 5179–5186.

# Disrupting glucose-6-phosphate isomerase fully suppresses the 'Warburg effect' and activates OXPHOS with minimal impact on tumor growth except in hypoxia

M. Cunha de Padua<sup>1,4,\*</sup>, G. Delodi<sup>1,\*</sup>, Milica Vučetić<sup>2</sup>, Jérôme Durivault<sup>2</sup>, Valérie Vial<sup>2</sup>, Pascale Bayer<sup>3</sup>, Guilhermina Rodrigues Noleto<sup>4</sup>, Nathalie M. Mazure<sup>1</sup>, Maša Ždravlević<sup>1</sup> and Jacques Pouyssegur<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, IRCAN, CNRS, Inserm, Centre A Lacassagne, Nice, France

<sup>2</sup>Medical Biology Department, Centre Scientifique de Monaco (CSM), Monaco

<sup>3</sup>Université Côte d'Azur, University Hospital Pasteur, Clinical Chemistry Laboratory, Nice, France

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil

\*These authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** Jacques Pouyssegur, **email:** pouysseg@unice.fr  
Maša Ždravlević, **email:** masa.zdravlevic@unice.fr

**Keywords:** glycolysis, OXPHOS, pentose phosphate pathway, glucose-6-phosphate isomerase, tumor growth

**Received:** July 23, 2017

**Accepted:** August 23, 2017

**Published:** September 18, 2017

**Copyright:** de Padua et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ABSTRACT

As Otto Warburg first observed, cancer cells largely favor fermentative glycolysis for growth even under aerobic conditions. This energy paradox also extends to rapidly growing normal cells indicating that glycolysis is optimal for fast growth and biomass production. Here we further explored this concept by genetic ablation of fermentative glycolysis in two fast growing cancer cell lines: human colon adenocarcinoma LS174T and B16 mouse melanoma. We disrupted the upstream glycolytic enzyme, glucose-6-phosphate isomerase (*GPI*), to allow cells to re-route glucose-6-phosphate flux into the pentose-phosphate branch. Indeed, *GPI*-KO severely reduced glucose consumption and suppressed lactic acid secretion, which reprogrammed these cells to rely on oxidative phosphorylation and mitochondrial ATP production to maintain viability. In contrast to previous pharmacological inhibition of glycolysis that suppressed tumor growth, *GPI*-KO surprisingly demonstrated only a moderate impact on normoxic cell growth. However, hypoxic (1% O<sub>2</sub>) cell growth was severely restricted. Despite *in vitro* growth restriction under hypoxia, tumor growth rates *in vivo* were reduced less than 2-fold for both *GPI*-KO cancer cell lines. Combined our results indicate that exclusive use of oxidative metabolism has the capacity to provide metabolic precursors for biomass synthesis and fast growth. This work and others clearly indicate that metabolic cancer cell plasticity poses a strong limitation to anticancer strategies.

## INTRODUCTION

In contrast to normally differentiated cells that derive their energy from oxidative phosphorylation (OXPHOS), it is now well documented that the majority of rapidly developing tumors depend primarily on fermentative glycolysis even when oxygen is plentiful,

a phenomenon referred to as the "Warburg effect" [1–4]. This high glycolytic phenotype, also called 'glycolytic addiction', results from the conjunction of uncontrolled growth signaling, deregulated c-Myc and hypoxia-induced factor 1 (HIF-1) activity leading to induction of glycolytic enzymes and inhibition of mitochondrial pyruvate oxidation [5–7]. This unique metabolic cancer phenotype



has prompted many studies to investigate whether specific inhibition of glycolysis in tumors may have therapeutic benefit. Initially, studies exploited inhibition of the first glycolytic step with 2-deoxy-glucose (2-DG), a competitive inhibitor of glucose transport but also an inhibitor of hexokinase and glucose-6-phosphate isomerase [4, 8, 9]. Unfortunately, clinical use of 2-DG is greatly limited due to toxicity as it inhibits the dual metabolic flux of glycolysis and oxidative Pentose Phosphate Pathway (PPP). Other investigators have explored inhibition, gene silencing or disruption of specific downstream steps of glycolysis, namely lactate dehydrogenases A and B [10–13] or the final step of lactic acid export *via* the H<sup>+</sup>/lactate symporters (monocarboxylate transporters 1 and 4, MCT1 and MCT4) [14–17].

Here we report on the metabolic adaptation and consequent impact on tumor growth following disruption of the most upstream glycolytic step, the inter-conversion between glucose-6-phosphate (G6P) and fructose-6-phosphate (F6P), catalyzed by Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI), with preservation of the oxidative PPP metabolic flux. Genetic disruption of *GPI* was generated in two aggressive cancer cell lines: the human colon adenocarcinoma LS174T and the mouse B16 melanoma. Both of these cell lines display a high glycolytic rate and rapid tumor growth in immune-compromised mice [11, 17]. As expected, *GPI*-knockout (*GPI*-KO) ablated the fermentative glycolytic flux in the two cell lines as measured by the full suppression of lactic acid release in normoxia or hypoxia (less than 1% of the parental cell value). Surprisingly, *GPI*-KO cell growth in normoxia is minimally reduced and maintained by a reprogrammed metabolic oxidative phenotype, essential for anabolism, ATP biosynthesis, viability and *in vitro* growth. Consequently, these *GPI*-KO mutant cancer cells became oxygen-dependent for growth and therefore extremely sensitive to respiratory chain inhibitors.

## RESULTS

### Genetic disruption of Glucose-6-phosphate isomerase (*GPI*) in LS174T and B16 cancer cell lines induces expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP)

Previous attempts to knock-down *GPI* in the LS174T cancer cell line with doxycycline-inducible short hairpin (sh) RNA showed that 90% silencing of GPI enzymatic activity did not change the rate of glycolysis, indicating the limits of shRNA use for non-limiting enzymes (Laferrière J. and Pouyssegur J. unpublished results). We therefore disrupted the *GPI* gene with CRISPR/Cas9 in both human colon adenocarcinoma LS174T and mouse B16 melanoma cell lines (Figure

1). The complete disruption of *GPI* alleles was attested by immunoblotting in normoxia (Nx) and hypoxia (Hx) (Figures 1A and 1B) and more importantly by enzymatic assay (Figures 1C and 1D). The rate of GPI enzymatic activity was monitored spectrophotometrically, as described in the Materials and Methods section, and was shown to be completely abolished in the two *GPI*-KO cell lines, confirming functional invalidation of the protein.

Interruption of the glucose flow at the GPI glycolytic step is assumed to increase intracellular glucose-6-phosphate (G6P). An interesting proposed nuclear sensor of this metabolite is the transcription factor complex, MondoA-Mlx, that induces among other genes Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), a potent negative regulator of glucose uptake [18]. Interestingly, this fine regulation by TXNIP triggers a feedback loop that restricts glucose transporter (GLUT1) activity [19], an “old” observation referred to as “hexose transport curb” [9, 20]. We indeed observed that in the conditions of 24h glucose starvation only the two cell lines disrupted for *GPI* expressed TXNIP in normoxia and hypoxia (Figure 1B), and had decreased GLUT1 expression. The exclusive expression of TXNIP in the two *GPI*-disrupted cell lines fully supports the fine-tuning feedback regulation of glucose transport [18, 19] illustrated in Figure 1E.

### Consequences of *GPI* disruption on *in vitro* growth in normoxia or hypoxia

We first analyzed and compared the exponential growth in regular medium (DMEM) of two independent *GPI*-KO clones issued from the highly glycolytic cell line LS174T [17]. Surprisingly, in Figure 2A, we show that the *in vitro* growth of *GPI*-KO cells in normoxia is reduced only about two-fold after 5 days. In contrast, the growth in hypoxia (1% O<sub>2</sub>) is severely restricted (> 90% inhibition) after 5 days (Figure 2B). Both in normoxia and hypoxia, cell viability remains unchanged (Figure 2A and 2B, bars, right scale), and cannot account for the reduced rate of cell proliferation. Identical findings were obtained for *GPI*-KO clone #2 (data not shown).

For the mouse melanoma cell line B16 that exhibits dual high rates of glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS) as seen later, *Gpi* disruption affected growth similarly as for the colon adenocarcinoma cell line LS174T. We observe about two-fold growth rate reduction in normoxia (Figure 2C) and almost total absence of growth in hypoxia (Figure 2D). Again, viability of B16 *Gpi*-KO was not affected after 5 days of culture neither in normoxia nor in hypoxia (Figure 2C, 2D, bars, right scale).

### *GPI*-knockouts fully suppress “Warburg effect” in colon and melanoma cancer cell lines

The results of metabolic flux studies comparing wild type (WT) and *GPI*-KO in the two cancer lines

are presented in Figure 3A and 3B. Upon glucose addition, a rapid and strong extracellular acidification rate (ECAR) is observed in both WT cell lines, and it is further increased (approximately doubled) upon oligomycin addition (Figures 3A and 3B), reflecting the cells glycolytic capacity. In contrast, the two *GPI*-KO cell lines display an identical profile: low acidic release upon glucose addition and absence of the acid release burst in response to oligomycin addition (Figures 3A and 3B). This very low ECAR profiles in *GPI*-KO cell lines are consistent with genetic interruption of the glycolytic flow.

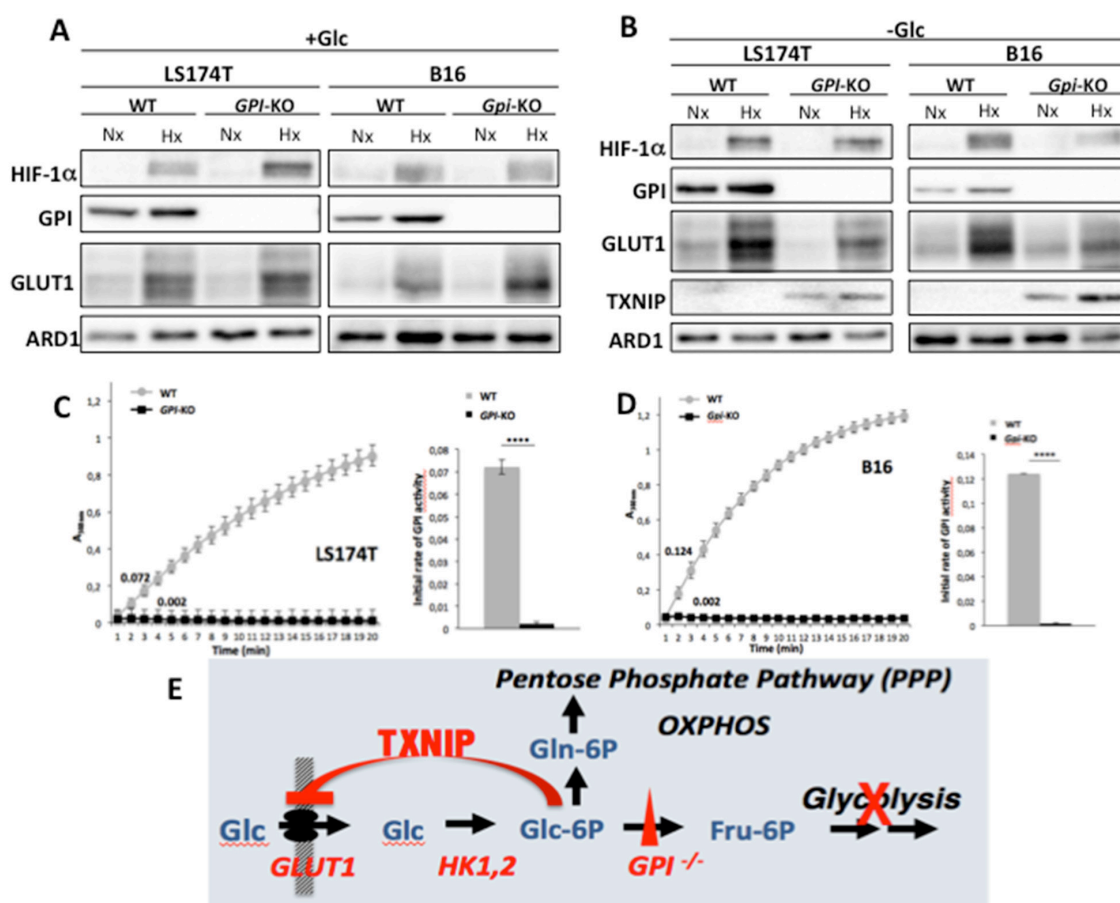
Complete ablation of fermentative glycolysis in *GPI*-null cell lines is further demonstrated by measuring the release of lactic acid of cells cultivated under normoxic or hypoxic conditions (Figure 3C, 3D). Both WT cell lines are moderately glycolytic in normoxia, an action that is 6-fold stimulated when the cells were cultivated for 48h

in 1% oxygen. Under the same conditions, *GPI*-null cells did not secrete lactic acid (no detectable in normoxia and less than 1% in hypoxia, Figure 3C, 3D) and glucose consumption was reduced by more than 95% compared to WT cell lines. Thus, the ECAR (acid release) observed in *GPI*-null cells in Figure 3A, 3B upon glucose addition must be due to carbonic and not lactic acid release, as we will confirm in the next section.

We conclude that *GPI* disruption fully eradicate fermentative glycolysis (“Warburg effect”) in the two cancer cell lines from colon adenocarcinoma and melanoma.

### ***GPI*-knockouts re-direct glucose metabolism through OXPHOS in colon and melanoma cancer cell lines**

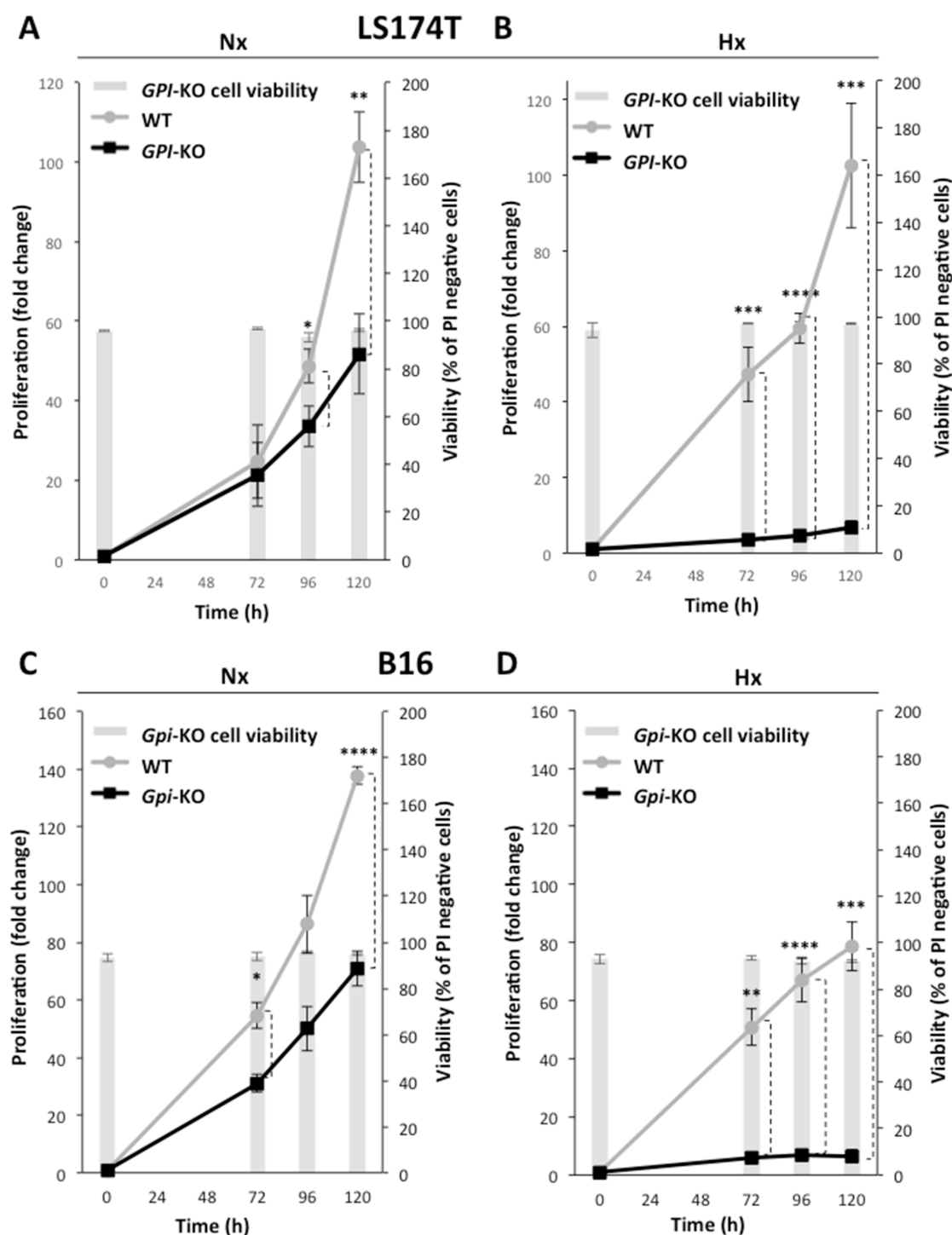
Oxygen consumption rates (OCR), complementary of the experiment depicted in Figure 3A, 3B, are represented



**Figure 1: *GPI* disruption affects GLUT1 and TXNIP expression levels and GPI-enzymatic activities in LS174T and B16 cells.** Immunoblot analysis of HIF-1 $\alpha$ , GPI, GLUT-1 and TXNIP after 24h in normoxia (Nx) and hypoxia (Hx), in WT and *GPI*-KO cells in the presence of 25 mM glucose (+Glc) (A) or absence of glucose (-Glc) (B). ARD1 was used as loading control. (C, D) enzymatic assay of GPI activity in WT and *GPI*-KO cells was performed by continuous spectrophotometric rate determination. Numbers along the curves represent initial rates of the reaction. The results presented are representative of four independent experiments. In the right inserts of both figures, average value of the initial rates of GPI activity in WT and *GPI*-KO cells was plotted. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (E) Schematic representation of the regulation of glucose transport in *GPI*-KO cells.

in Figure 4A, 4B. Addition of glucose in WT LS174T cells slightly decreases OCR and further additions of oligomycin and FCCP (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone), a potent mitochondrial OXPHOS

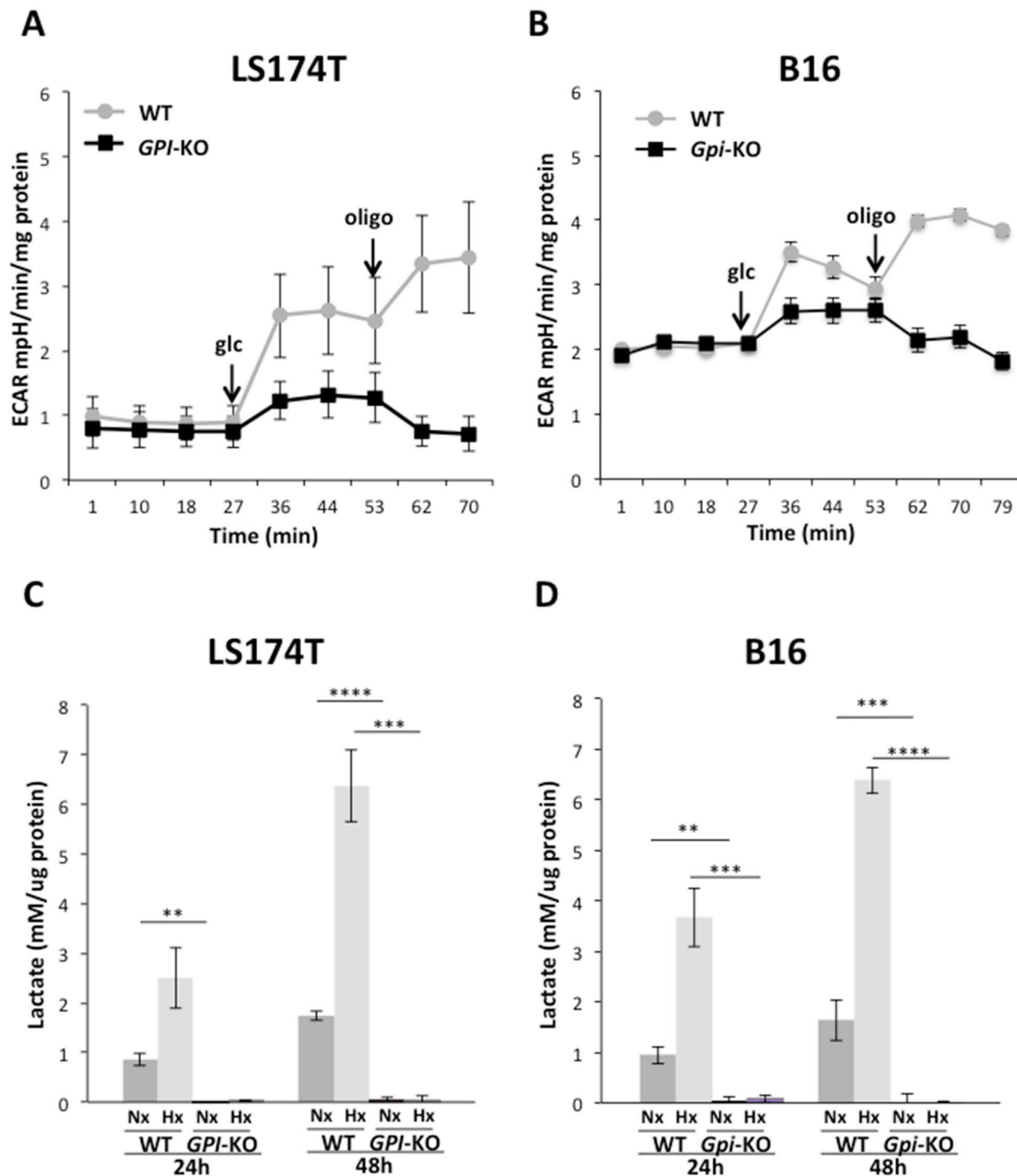
uncoupler, confirm that these glycolytic cells display a very low rate of oxygen consumption (Figure 4A), as previously reported [17]. In sharp contrast, addition of glucose to *GPI*-null LS174T cells (Figure 4A) causes a marked increase in



**Figure 2: Cell growth and cell viability of WT and *GPI*-KO cells in normoxia and 1% hypoxia.** Cell proliferation and viability of LS174T WT and *GPI*-KO in Nx (A) or Hx (B) up to 120h. Cell proliferation of B16 WT and *Gpi*-KO in Nx (C) and in Hx (D), up to 120h. The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of four independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.003$ , \*\*\*  $p < 0.0003$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

OCR, abolished by oligomycin. Addition of FCCP, followed by Rotenone and Antimycin A indicates a very robust respiratory capacity on glucose *via* the Pentose Phosphate Pathway. The situation is different for the B16 WT (Figure 4B). This cell line, in spite of a very active glycolytic rate (Figure 3B, 3D), displays a rather strong respiratory capacity contrasting with that of LS174T WT cells. As it was the case with LS174T cell lines, B16 WT cells decrease their

OCR and *Gpi*-null cells maintain the steady increased OCR upon glucose addition. This OCR is inhibited by oligomycin in both cell lines, reflecting the level of mitochondrial contribution to the ATP production, since oligomycin inhibits ATP synthase (Complex V) of the mitochondrial respiratory chain. However, the addition of uncoupler (FCCP) was unable to restore the respiration in *Gpi*-KO cells, indicating a possible mitochondrial dysfunction (Figure 4B).

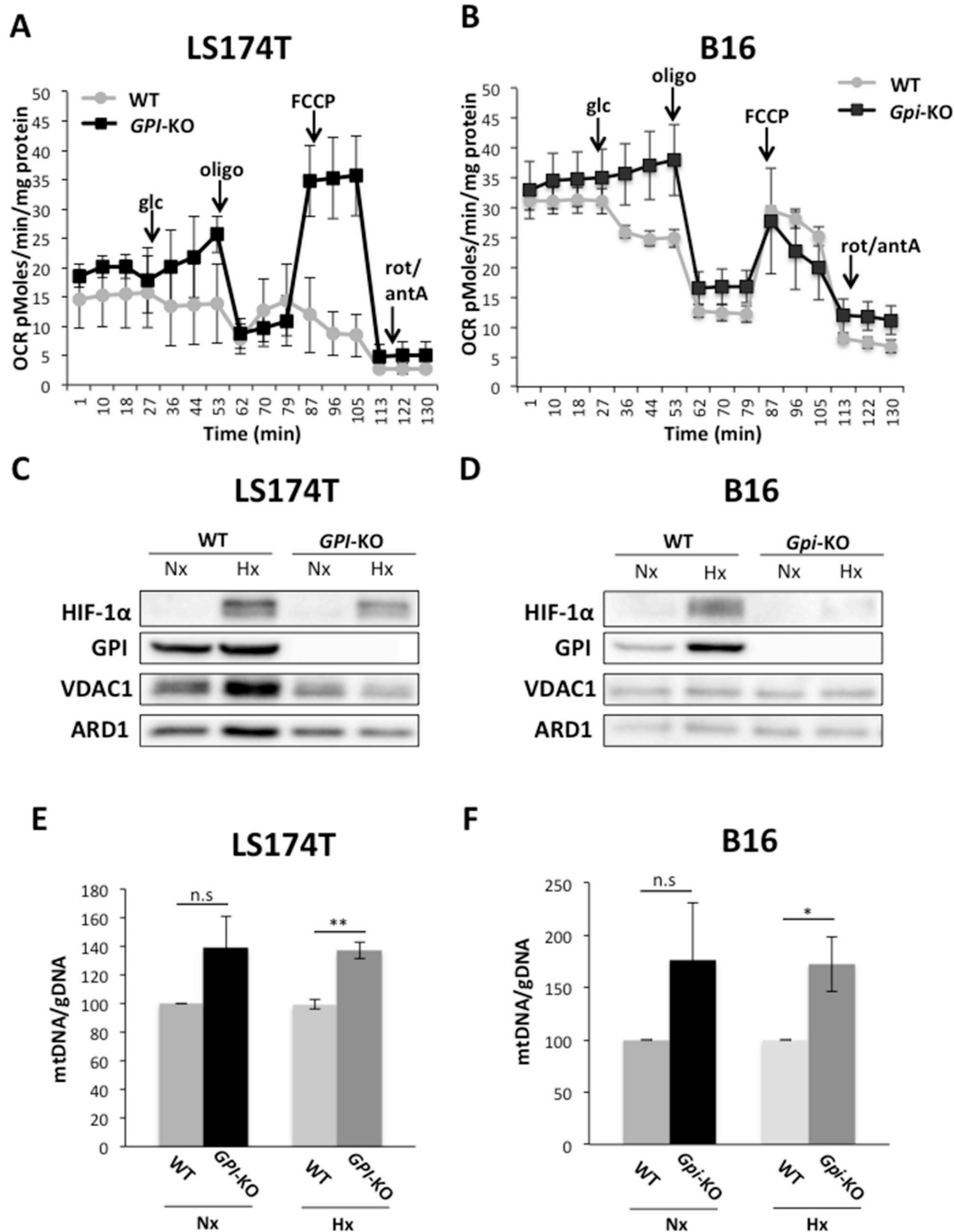


**Figure 3: GPI-KOs disrupt glycolysis and abolish lactic acid production.** Extracellular acidification rate (ECAR) of LS174T (A) and B16 (B) WT and *GPI*-KO cells in Nx, analyzed with Seahorse XF24 bioanalyzer. The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of four independent experiments performed in quadruplicate. Lactate levels of WT and *GPI*-KO LS174T (C) and B16 (D) cells grown in Nx or 1% Hx secreted in 24- and 48-h and quantified by Cobass c701 (Roche). Data were normalized by protein content and the mean  $\pm$  S.E.M. are representative of five independent experiments. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



The question of whether the abolition of fermentative glycolysis and re-activation of OXPHOS had increased mitochondrial content during the phase of mutant selection/ expansion was addressed by assessing expression of the major mitochondrial channel VDAC1 (Figure 4C, 4D) and

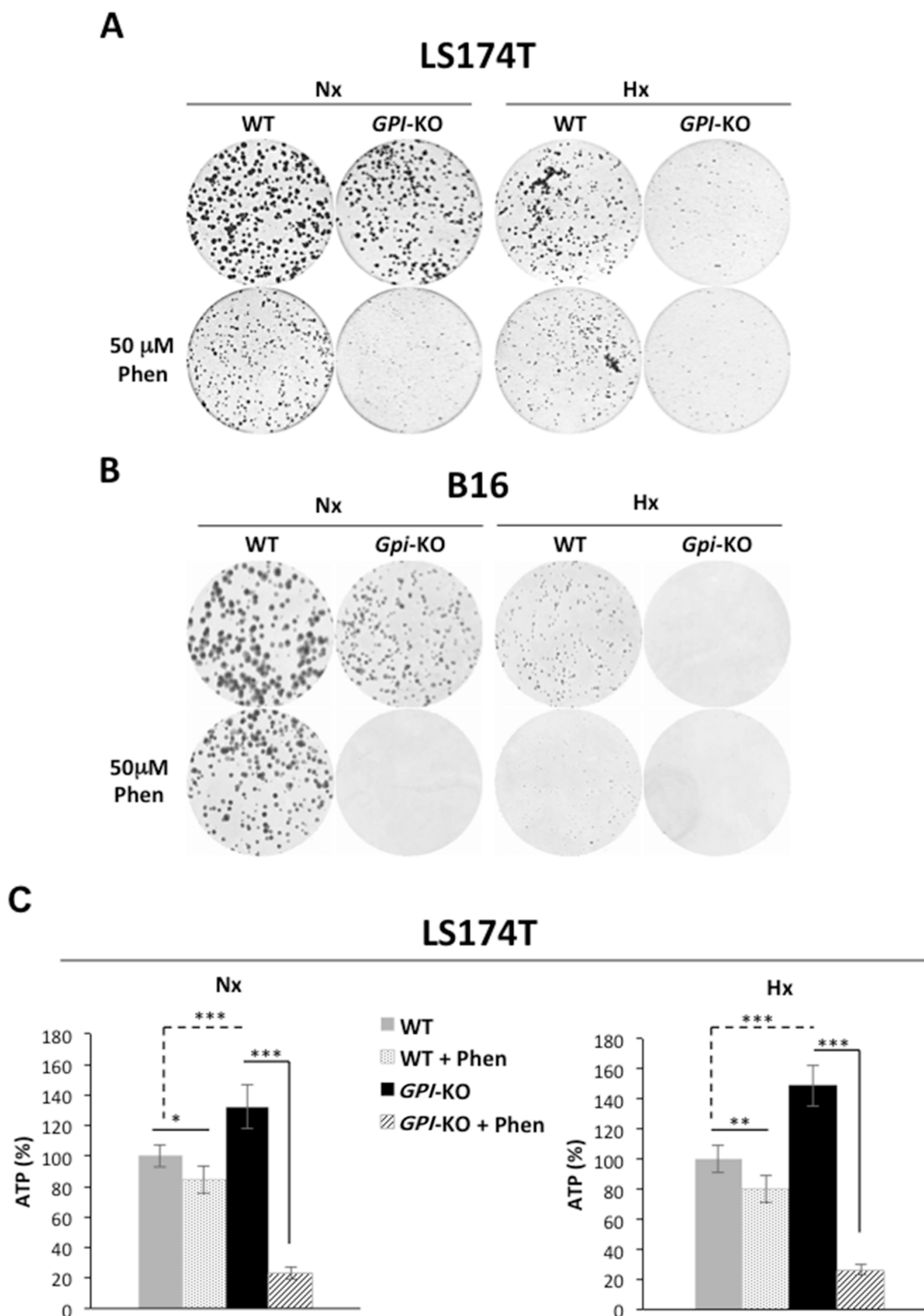
the mitochondrial (mt)/genomic (g) DNA ratio (Figure 4E, 4F). In both LS174T and B16 cells, *GPI-KO* had a slight increase in mt/gDNA ratio in hypoxia, but not higher VDAC1 expression with respect to the WT cells, thus this hypothesis has been rapidly eliminated.



**Figure 4: Oxidative metabolism of glucose is activated in *GPI-KO* cells.** Oxygen consumption rate (OCR) of LS174T (A) and B16 (B) WT and *GPI-KO* cells evaluated with Seahorse XF24 bioanalyzer. The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of four independent experiments performed in quadruplicate. VDAC1 protein levels in WT and *GPI-KO* cells in Nx and 1% Hx, in LS174T (C) and B16 (D) cells. (E) and (F) mtDNA/gDNA ratio content of WT and *GPI-KO* cells evaluated by qPCR. The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of four independent experiments performed in duplicate. \*  $p < 0.03$ , \*\*  $p < 0.003$ .

Since *GPI*-null cells rely exclusively on OXPHOS for their energy production, we next compared and explored their clonogenicity/viability in response to

the mitochondrial complex I inhibitor, phenformin. As shown in Figure 5A and 5B, the growth of both *GPI*-KOs was restricted in normoxia and more severely in 1% Hx



**Figure 5: *GPI* disruption sensitizes tumor cells to phenformin both in normoxia and in hypoxia by decreasing cellular ATP levels.** Clonal growth of LS174T (A) and B16 (B) WT and *GPI*-KO cells in Nx and Hx, treated or not with 50  $\mu$ M phenformin (Phen). The results are representative of three independent experiments. (C) ATP levels in WT and *GPI*-KO LS174T cells in Nx and 1% Hx in the absence or presence of phenformin (Phen - 50 $\mu$ M) for 24h. Values were standardized to the cell protein content and normalized to initial cellular ATP level (%). The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of two independent experiments carried out in quadruplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

hypoxia. Both LS174T and B16 WT cells showed a slight sensitivity to 50 $\mu$ M phenformin treatment, whereas *GPI*-KO cells were extremely sensitive, both in normoxia and in hypoxia. This loss of viability was shown to be due to the huge drop in ATP levels (Figure 5C) in *GPI*-KO cells treated with phenformin. Note that *GPI*-KO cells, due to their oxidative metabolism, had higher ATP levels with respect to the WT cells, both in normoxia and in hypoxia.

Therefore, we showed that *in vitro*, *GPI*-KO cells (LS174T and B16) have re-routed glucose metabolism *via* the oxidative Pentose Phosphate Pathway, an action that has reduced only by 2-fold the rate of proliferation. However, *GPI*-disruption has suppressed proliferation in hypoxia and rendered these cells extremely sensitive to OXPHOS inhibitors.

### ***GPI*-KO increases ROS levels in B16 cells**

Having demonstrated that *GPI*-KO cells have oxidative metabolism and rely on the OXPHOS for their ATP production, we hypothesized that this increase in OXPHOS activity could result in increased reactive oxygen species (ROS) production. Indeed, ROS levels were significantly higher in LS174T cells in hypoxia and in B16 *Gpi*-KO cells both in normoxia and in 1% hypoxia (Figures 6A and 6B). Consequently, treatment with N-acetyl-cysteine (NAC), known to replenish the limiting cysteine precursor of the major cellular antioxidant glutathione, increased the viability of *GPI*-KO cells (Figures 6C and 6D).

### **Tumor growth is impacted only moderately by *GPI* disruption**

To answer the question of whether lack of *GPI* in tumor cells, which caused the shift in their metabolism to OXPHOS *in vitro* will affect their tumorigenicity, we injected subcutaneously 1 $\times$ 10<sup>6</sup> WT and *GPI*-KO cells, both LS174T and B16, into 8-weeks-old *nude* female mice and monitored the tumor growth rates. The experiment with the LS174T cells was stopped 16 days after the injection, when tumors in WT group reached 1000 mm<sup>3</sup> (Figure 7A). The onset of tumor appearance was almost indistinguishable between WT and *GPI*-KO cells (Figure 7A), but the kinetics of tumor growth was slightly different. *GPI*-KO tumors showed a slower growth rate and reached approximately 60% of that of the WT tumors by the end of the experiment. The B16 WT tumors showed more aggressive behaviour, and the experiment was stopped after 10 days, when WT tumors reached 1000 mm<sup>3</sup> (Figure 7B). Similarly to LS174T, B16 *Gpi*-KO tumors had a slower growth rate and reached only about 50% of that of WT tumors, showing that *Gpi* disruption had a modest effect on tumor growth *in vivo*. Tumors were then excised and analyzed for GPI expression by immunoblotting (Figure 7C), which confirmed the absence of protein in *GPI*-KO tumors.

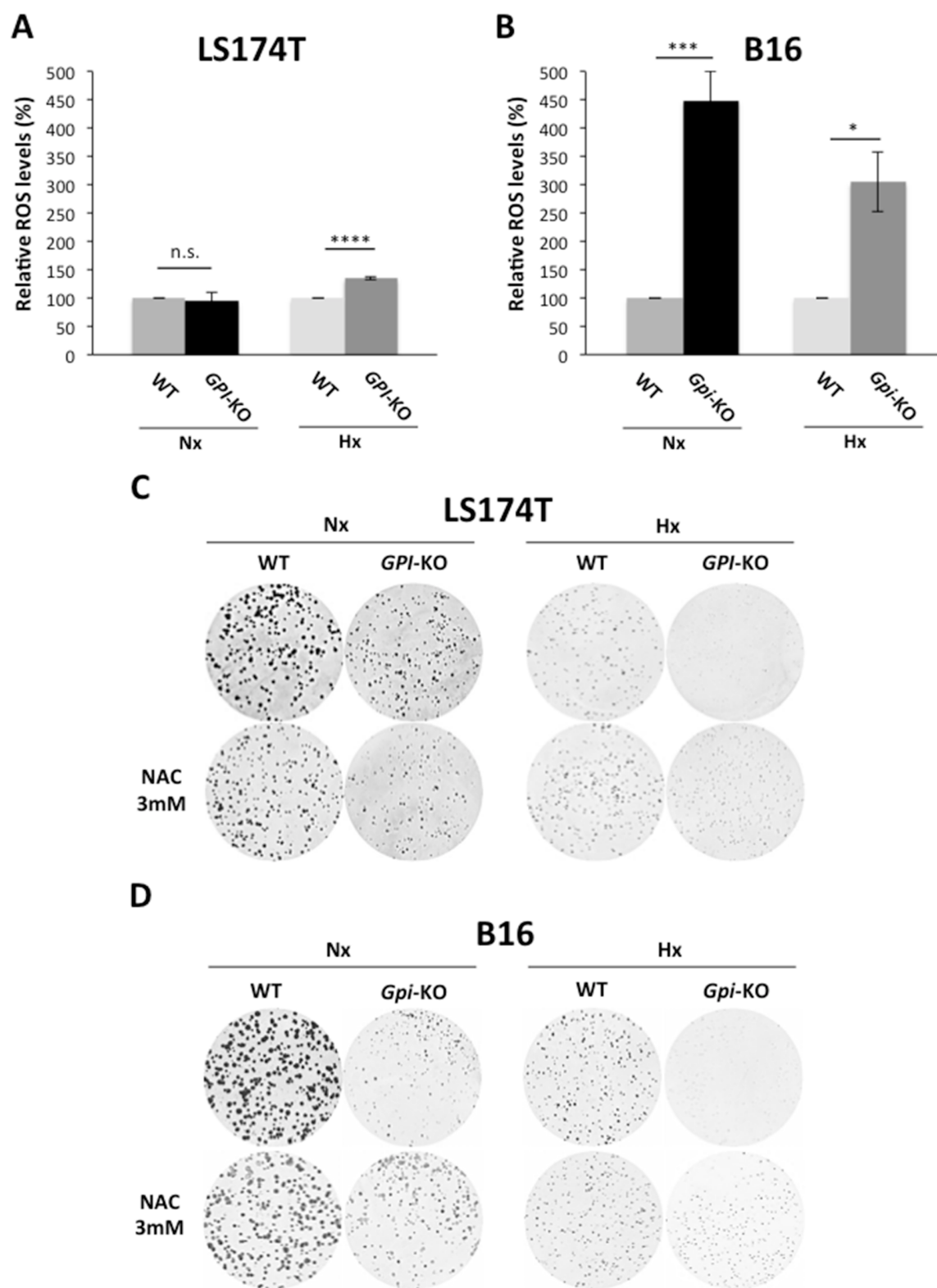
## **DISCUSSION**

### **Is glucose-6-phosphate isomerase a moonlight protein?**

GPI is an essential glycolytic and gluconeogenic enzyme that catalyzes the reversible isomerization between glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. This step, found at the intersection of Embden-Meyerhof pathway (glycolysis) and pentose phosphate pathway (PPP), occupies a critical role in glucose metabolic fate. Glucose metabolic flux could be routed through different ‘PPP/glycolysis’ ratios depending on oxygen and glucose concentrations in the microenvironment and the proliferation/differentiation status of the cell. GPI expression, like most glycolytic enzymes, is induced by cMyc [21] and HIF-1 [22] and is increased in many cancers [8, 22]. GPI has also been described as an extracellular cytokine, called autocrine motility factor (AMF), and in conjunction with its receptor gp78/AMFR appears to be involved in several pathways linked to metastasis including glycolysis, matrix remodeling, ER-associated degradation and receptor signaling and endocytosis [23]. However, questions remain about these disparate functions due to lack of firm experimental demonstration and now with the generation of *GPI* genetic disruption it will be important to investigate the alternate functions associated with “secreted” GPI [23]. Multiple functions of GPI are not unique as many ancient metabolic enzymes referred to as moonlight proteins [24, 25] share this multi-functionality that will have to be further investigated and critically assessed by gene disruption.

### **Glycolytic “addicted” tumors survive and escape the full ablation of the “Warburg effect”**

Most rapidly growing tumors exhibit an increased dependency on glycolysis in comparison to normal tissue. This phenomenon, referred to as glycolytic “addiction”, in place of oxidative phosphorylation for ATP production has long been thought to be a point of cancer vulnerability. Many examples of pharmacological inhibition of members of the upstream (2-DG) [4, 8, 9] or downstream (LDHA) [10–13] glycolytic pathway were shown to be effective in blocking tumor growth but the associated toxicity and low benefit of this approach prevented their development in the clinic [4, 8, 9, 26]. In contrast to these pharmacological studies, our work revealed that genetic abolition of fermentative glycolysis (*GPI*-KO) in the two cell lines LS174T and melanoma B16 does not suppress tumor growth. Tumor cell growth was only reduced by two-fold *in vitro* (normoxia) and *in vivo* (xenografts), whereas in hypoxia (1% O<sub>2</sub>) *in vitro* assays, *GPI*-KO cells survive but stop growing. These findings are consistent with the metabolic plasticity and capacity of metazoans to derive their energy and anabolic precursors from both

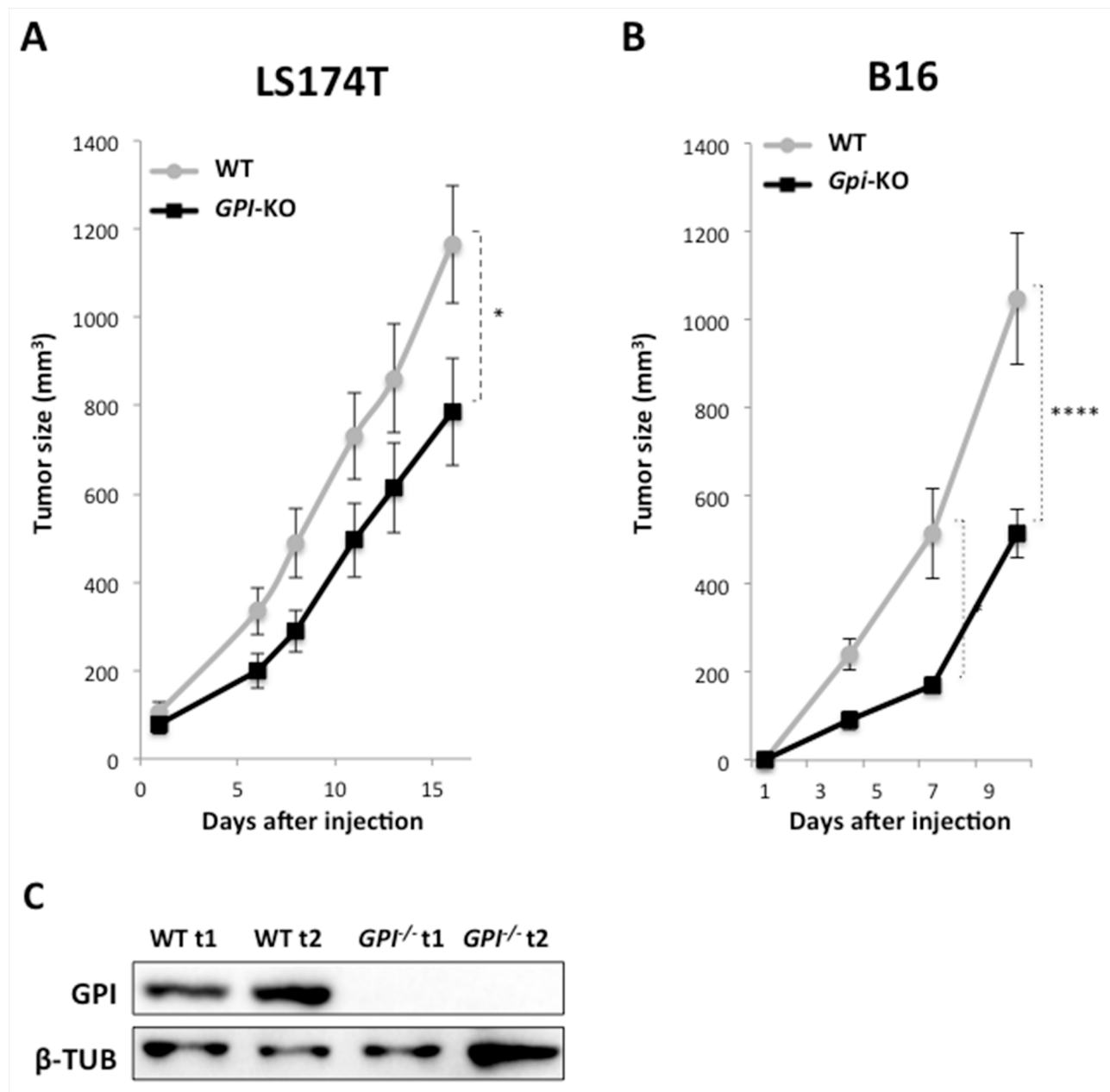


**Figure 6: B16 *Gpi*-KO cells display a strong increase in ROS production.** ROS levels in WT and *GPI*-KO cells in Nx and in Hx at 24h, in LS174T (A) and B16 (B) standardized to the cell protein content and expressed as percentage of WT Nx, to which a value of 100% was given. The mean  $\pm$  S.E.M. is representative of five independent experiments carried out in quadruplicate. \*  $p < 0.0350$ , \*\*\*  $p < 0.0004$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Clonogenic assay of LS174T (C) and B16 (D) WT and *GPI*-KO cells in Nx and Hx, in the absence or presence of N-acetyl-L-cysteine (NAC- 3 mM).

fermentative and OXPHOS pathways. In contrast to WT cells, the increased dependence on the OXPHOS pathway in *GPI*-KO cells accounts for their extreme sensitivity to respiratory chain inhibitors (oligomycin, phenformin) and oxygen-dependence for growth. Identical findings were recently obtained on the same two cell lines by a double gene disruption of *LDHA/LDHB* that fully suppressed fermentative glycolysis with a minimal effect on tumor growth (Maša Ždralović and Jacques Pouyssegur, unpublished data). We therefore propose that the

previously used glycolysis inhibitors were most effective in blocking tumor growth because of their metabolic dual effects (2-DG) or off-target effects (LDHA inhibitors).

Two recent and interesting studies from Genentech have evaluated tumor growth arrest and metabolism reprogramming by pharmacological blockade of glycolysis at the level of GPI [8] or by more specific inhibitors of LDHA/B [10]. Both studies revealed that most of the tumor cell lines analyzed stopped growing and died with this pharmacological approach. However,



**Figure 7: Xenograft tumor growth is minimally impacted by *GPI*-KO in both LS174T and B16 cancer cell lines.** Tumor volume of WT and *GPI*-KO LS174T cells xenografts (A) or mouse melanoma B16 WT and *Gpi*-KO cells (B).  $1 \times 10^6$  cells were injected in *nude* mice and the experiments were stopped once WT tumors reached 1000mm<sup>3</sup>. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . (C) Immunoblot analysis of two individual WT and two *GPI*-KO (*GPI*<sup>-/-</sup>t1, *GPI*<sup>-/-</sup>t2) tumors for GPI expression.



some cell lines can reprogram their metabolism and escape the glycolysis blockade in a way that sustains ATP levels, viability and growth as attested by an active mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) activity [8, 10]. We cannot exclude that in our genetic approach only a few *GPI*-KO or *LDHA/B*-DKO cells were able to escape the blockade of glycolysis and grow because they perform a more successful OXPHOS metabolic reprogramming. Future metabolomics studies will be developed comparing genetic and pharmacologic blockade of glycolysis on these cell lines.

### Lactic acidosis and immunometabolism

Finally, in the context of the tumor microenvironment, lactic acid secretion was recently shown to blunt the immune response in B16 melanoma by inhibiting tumor surveillance by T and NK cells [11, 27]. Similarly, deletion of *LDHA* in myeloid cells promoted accumulation of macrophages with a CD86<sup>high</sup> and MCP-1<sup>high</sup> M1-like phenotype that suppressed tumor growth [27]. The question of whether lactate, acidosis or both are involved remains to be addressed. In regard to this question it is important to recall that tumor acidity has been previously reported to be independent of glycolysis [28]. With the melanoma B16 *Gpi*-KO cell line developed here or the *LDHA/B*-DKO (unpublished data) in which lactic acidosis is substituted for carbonic acidosis (OXPHOS-dependence), this important question should be simple to address experimentally.

In conclusion, we demonstrated that although complete genetic disruption of the Warburg effect seriously reduced hypoxic *in vitro* cell growth, it is dispensable for *in vivo* tumor growth of aggressive cancers. These findings further illuminate the metabolic plasticity of cancer cells and complicate the clinical anticancer approaches targeting metabolism. As we previously discussed [29, 30], glycolysis inhibition approaches (MCT, LDH, RTKs... inhibitors) will have to be combined with an acute and very short phenformin treatment that we refer to as ‘metabolic knife’ [29]. This anticancer strategy is still awaiting pre-clinical evaluation.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and hypoxic exposure conditions

Human colon adenocarcinoma LS174T cells (kindly provided by Dr. Van de Wetering, NL), and mouse B16 F10 (kindly provided by Pr. Marina Kreutz, Regensburg, Germany) were grown, unless otherwise specified, in Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM, Gibco by Life Technologies Corporation, Paisley, UK) and Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (10 U/mL) and streptomycin (10 µg/mL). In normoxic conditions, cells

were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>/21% O<sub>2</sub> at 37 °C. In hypoxic conditions the cells were maintained in 1% O<sub>2</sub> in a sealed anaerobic workstation (*In Vivo* 400, Ruskinn Technology Ltd, Bridgend, South Wales) where the air was replaced by N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> was maintained at 5%.

### CRISPR/Cas9 - mediated knockout of mouse and human *GPI* gene

In order to get *GPI* knockout, human LS174T cells and mouse B16 F10 cells were respectively transfected with CRISPR/Cas9 using pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). This plasmid was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #48138) [31] bearing GFP-encoding region designed by J. Durivault (Centre Scientifique de Monaco). The small guide RNA (sgRNA) was designed using the CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu>). Transfections were performed with JetPRIME® (Polyplus transfection, Illkirch, France) and GFP positive cells were detected by cell sorting (FACS). Each clone was analyzed for GPI expression by immunoblot and enzymatic assay. Finally, two independent *GPI* knockout clones for human and mouse cell lines were selected for this study. Since the findings obtained were identical for the two clones, we showed the results of one of the clones for both cell lines for simplicity reasons.

### Immunoblotting

Cells were lysed with SDS buffer and the protein concentration was determined using the BCA assay (Interchim, Montluçon, France). Proteins (40 µg) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Merck Millipore Ltd, Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). Membranes were blocked in 5% non-fat milk in TN buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) and blotted with the antibodies for GPI (Abcam, ab118149), HIF-1α (rabbit anti-human/mouse polyclonal antibody, produced in our laboratory), GLUT1 (Abcam, ab652), TXNIP (MBL, K0204-3) and VDAC1 (Abcam, ab15895). Antibody against ARD1 (rabbit anti-human/mouse ARD1 produced in our laboratory) was used as loading control. Immunoreactive bands were detected with the ECL system (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) after the incubation of membrane with secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Promega) and visualized using GeneSys software (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

### Preparation of cell extracts for enzymatic assays

Cells (1 × 10<sup>5</sup>) were seeded in 6-well plates and after 24h of incubation in normoxia and hypoxia they were transferred on ice, washed once with 2ml cold PBS, once

with 2ml cold dH<sub>2</sub>O, added with 300µl dH<sub>2</sub>O and put at -80 °C for minimum 10 min. Cells were taken out on ice, transferred into eppendorf tubes by scratching, centrifuged at 4 °C (8000 × g for 10 min) and the supernatant corresponding to the cell extract was transferred to new tubes and stored at -80 °C if not analyzed immediately.

### Enzymatic activity assay

Enzymatic assay of glucose-6-phosphate isomerase (GPI) activity in WT and *GPI*-KO cells was performed by continuous spectrophotometric rate determination (Glomax, Promega BioSystems Inc., Sunnyvale, CA, USA). GPI activity was determined by a coupled enzyme assay in which glucose-6-phosphate is converted in 6-phosphogluconate by glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH), coupled with concomitant β-NADP<sup>+</sup> reduction to β-NADPH, that can be monitored spectrophotometrically as an increase in absorbance at 340nm, which is the maximum absorption of the reduced cofactor form. This reaction will occur only in presence of GPI in the added cell extract, which will convert fructose-6-phosphate into glucose-6-phosphate. Reaction is performed at pH 7.4 and 25 °C and it is started by adding 40µl of cell extract to reaction mixture containing 42mM glycylglycine buffer, pH 7.4; 3.3mM D-fructose-6-phosphate; 0.67mM β-NADP<sup>+</sup>; 5.0 units of G-6-PDH and 3.3mM MgCl<sub>2</sub>. Results of four independent experiments were reported as mean values of slopes (tangent time 1) corresponding to the initial rate of the reaction, normalized to µg of protein.

### Proliferation and cell viability assay

Cells (5×10<sup>4</sup> for LS174T and 2×10<sup>4</sup> for B16) were seeded in 6-well plates in triplicate per cell line and condition. 24h after seeding cells were detached by trypsinization and counted with an automatic cell counter (ADAM-MC™, Digital Bio, NanoEnTek Inc., Seoul, Korea) (day 0). Cell proliferation index was calculated by dividing the cell number obtained for each day by the one obtained 24 hours after seeding.

For determining cell viability, the supernatant taken at indicated time points was collected and cells were washed with PBS, trypsinized, centrifuged (5min, 1000 rpm), added to the supernatant taken previously and resuspended in propidium iodide solution in order to discriminate between live and dead cells. Three independent experiments were performed in duplicate.

### Metabolic flux analysis

Oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rates (ECAR) of cells were analyzed by Seahorse XF24 extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, MA, USA). Cells were seeded on Seahorse plates in order to reach confluency in 24h. One hour prior to

measurement, cell media was replaced by the assay medium (without glucose, pyruvate, serum and buffer, D5030, Sigma) and the plates were incubated in a non-CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. Basal levels of OCR and ECAR were recorded for 24 min, followed by a mitochondrial stress test (1 µM oligomycin, 3 µM FCCP, 1 µM rotenone/1 µM antimycin A). Normalization to protein content was performed after each experiment and data were presented as mpH/min/µg protein for ECAR and as pMolesO<sub>2</sub>/min/µg protein for OCR.

### Extracellular glucose and lactate levels measurement

Cells (1×10<sup>6</sup>) were seeded in 10cm dishes and incubated for 24h and 48h in normoxia and in hypoxia, after which 500µl of supernatant is taken, centrifuged at 8000×g, 4 °C, for 5 minutes and lactate and glucose were analyzed in the same samples with Cobass c701 instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), in collaboration with the Biochemistry laboratory of the Nice University Hospital. The method used is based on enzymatic conversion of lactate into pyruvate by the lactate oxidase, coupled with the colorimetric reaction of hydrogen-peroxide formed in the first reaction with the hydrogen donor, resulting in a formation of colored compound, the intensity of which is measured spectrophotometrically and is directly proportional to the concentration of lactate. Glucose measurements were done by the hexokinase/glucose-6-P dehydrogenase coupled reaction in presence of ATP and NADP<sup>+</sup>. Three independent experiments were performed in duplicate, and the results were normalized to the quantity of the protein and expressed as mM lactate/µg protein.

### MtDNA analysis

Cells (1 × 10<sup>6</sup>) were seeded in 10 cm dishes and after 24h incubation DNA extraction was performed using AllPrep DNA/RNA kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). 30ng DNA for LS and 0.3ng DNA for B16 cells were used and the ratio of mt/gDNA was determined by quantitative PCR, by amplifying *hNADH*-dehydrogenase and *hLPL* (lipoprotein lipase) for the LS174T cells and *mCytB* (cytochrome b)/*mACT* (actin) for B16 cells and calculating the ratio of their expression, using *ddCt* method. Oligonucleotides for *hNADH*, *hLPL*, *mCytB* and *mACT* were kindly provided by dr D. Pisani (IBV, Nice). The qPCR was performed with Takyon™ Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Seraing, Belgium) on StepOnePlus Real Time PCR Machine (Applied Biosystems, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France).

### Clonogenic viability assay

Cells (1×10<sup>3</sup>) were seeded on 60mm plates and incubated for 24h, after which the medium was replaced

with DMEM 10% FBS with and without 50  $\mu$ M phenformin or 3mM NAC. After 8-10 days in normoxia and 12-15 days in hypoxia (1% O<sub>2</sub>), colonies were stained with 5% Giemsa solution (Sigma-Aldrich, Hannover, Germany) for 30 min for colony visualization.

### ATP measurement

Cells ( $1 \times 10^3$ ) were plated onto 96-well plate, allowed to adhere and then treated or not with phenformin (50 $\mu$ M) for 24h both in normoxia and in hypoxia. Intracellular ATP levels were measured using a Cell-Titer-Glo Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Protein normalization was performed after each experiment and the results were expressed as percentage of initial ATP level.

### ROS levels

Cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded onto 96-well-plate (Corning, black plate, clear bottom) in quadruplicate per cell line in normoxic and in hypoxic conditions. Cells were treated with 400 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5h before the measurement as a positive control. Treated and non-treated cells were washed with PBS and incubated with 5 $\mu$ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA-Sigma-Aldrich) for 30min at 37°C in the dark. DCF was then detected by an Infinite F200 PRO microplate reader (TECAN Trading AG, Switzerland) using excitation and emission wavelengths of 485 and 525 nm, respectively. Four independent experiments were performed and protein normalization was made after each experiment.

### Tumour xenografts

To generate tumors in mice,  $1 \times 10^6$  cells were suspended in 300  $\mu$ L of serum-free DMEM supplemented with insulin-transferrin-selenium (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland, UK) and injected subcutaneously into the back (LS174 cells) or the flank (B16 cells) of 8-week-old *nude* female mice (Harlan). Tumor dimensions were measured every 3–6 days using a caliper and the volume was determined by using the formula:  $(4\pi/3) \times L/2 \times W/2 \times H/2$  (L: length, W: width, and H: height). Once the tumor volume reached 1000mm<sup>3</sup>, mice were euthanized and the tumors were collected. All procedures were approved by i) the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nice-Sophia Antipolis (CIEPAL-azur agreement NCE/165) and ii) the animal experimentation protocol of the local animal care committee (Veterinary service and direction of sanitary and social action of Monaco, Dr H. Raps).

### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistical analysis was performed using ANOVA followed by non-parametric tests, using GraphPad Prism 5 Software. The differences between the groups were considered significant when  $p < 0.05$ .

### Abbreviations

GPI: glucose-6-phosphate isomerase; PPP: pentose phosphate pathway; OXPHOS: oxidative phosphorylation; NAC: N-acetyl-L-cysteine; Nx: normoxia; Hx: hypoxia; G6P: glucose-6-phosphate; TXNIP: thioredoxin-interacting protein; OCR: oxygen consumption rate; ECAR: extracellular acidification rate; ROS: reactive oxygen species.

### Author contributions

CdP, GD isolated and characterized the *GPI* mutant cells, JD designed the sgRNA for both mouse and human CRISPR-Cas9, PB, MŽ, GD performed lactate assays, NM, MŽ performed metabolic flux studies, CdP, MV, VV performed *in vivo* studies, MŽ, JP designed the project and wrote the manuscript.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Ludovic Cervera and CytoMed at the IRCANs' Flow Cytometry Facility for cell sorting assistance. The materials of CytoMed were supported by the Conseil Général 06, the FEDER, the Ministère de l'Enseignement Supérieur, the Région Provence Alpes-Côte d'Azur and the Inserm. Also, we would like to thank Claude Fabre and Claire Tworek, technicians of the Clinical Chemistry laboratory of the University Hospital of Nice and Dr. Scott K. Parks for English editing.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

### FUNDING

Monique Cunha de Padua from the Federal University of Parana, Brazil was awarded a one year CNPq Fellowship, Giulia Delodi from Genova University was awarded a 9-month Erasmus Fellowship (agreement n° 2016/102) and Maša Ždraljević was supported by a post-doctoral fellowship from the Fondation ARC on Cancer Research (grant n° PDF20151203643). JP, MV, JD, VV were funded by the Centre Scientifique de Monaco and a Grant from GEMLUC (MV, JP).

### REFERENCES

1. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13: 472-482.
2. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-1033.



3. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 269-270.
4. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 635-649.
5. Hsieh AL, Walton ZE, Altman BJ et al. MYC and metabolism on the path to cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 43: 11-21.
6. Hubbi ME, Semenza GL. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309: C775-782.
7. Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21: 67-72.
8. Pusapati RV, Daemen A, Wilson C et al. mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. *Cancer Cell* 2016; 29: 548-562.
9. Pouyssegur J, Franchi A, Salomon JC, Silvestre P. Isolation of a Chinese hamster fibroblast mutant defective in hexose transport and aerobic glycolysis: its use to dissect the malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 2698-2701.
10. Boudreau A, Purkey HE, Hitz A et al. Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LDHA inhibition. *Nat Chem Biol* 2016; 12: 779-786.
11. Brand A, Singer K, Koehl GE et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* 2016; 24: 657-671.
12. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9: 425-434.
13. Le A, Cooper CR, Gouw AM et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2037-2042.
14. Doherty JR, Yang C, Scott KE et al. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res* 2014; 74: 908-920.
15. Granja S, Marchiq I, Baltazar F, Pouyssegur J. Gene disruption using zinc finger nuclease technology. *Methods Mol Biol* 2014; 1165: 253-260.
16. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I et al. CD147 subunit of lactate/H<sup>+</sup> symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 16663-16668.
17. Marchiq I, Le Floch R, Roux D et al. Genetic disruption of lactate/H<sup>+</sup> symporters (MCTs) and their subunit CD147/ BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res* 2015; 75: 171-180.
18. Stoltzman CA, Kaadige MR, Peterson CW, Ayer DE. MondoA senses non-glucose sugars: regulation of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) and the hexose transport curb. *J Biol Chem* 2011; 286: 38027-38034.
19. Wu N, Zheng B, Shaywitz A et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell* 2013; 49: 1167-1175.
20. Ullrey DB, Franchi A, Pouyssegur J, Kalckar HM. Down-regulation of the hexose transport system: metabolic basis studied with a fibroblast mutant lacking phosphoglucose isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 3777-3779.
21. Kim JW, Zeller KI, Wang Y et al. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5923-5936.
22. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 2013; 123: 3664-3671.
23. Fairbank M, St-Pierre P, Nabi IR. The complex biology of autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase (AMF/PGI) and its receptor, the gp78/AMFR E3 ubiquitin ligase. *Mol Biosyst* 2009; 5: 793-801.
24. Huberts DH, van der Klei IJ. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 520-525.
25. Lincet H, Icard P. How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene* 2015; 34: 3751-3759.
26. Prasanna VK, Venkataramana NK, Dwarakanath BS, Santhosh V. Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma. *J Cancer Res Ther* 2009; 5: S44-47.
27. Seth P, Csizmadia E, Hedblom A et al. Deletion of Lactate Dehydrogenase-A in Myeloid Cells Triggers Antitumor Immunity. *Cancer Res* 2017; 77: 3632-3643.
28. Newell K, Franchi A, Pouyssegur J, Tannock I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1127-1131.
29. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 611-623.
30. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H<sup>+</sup> symporters. *J Mol Med (Berl)* 2016; 94: 155-171.
31. Ran FA, Hsu PD, Wright J et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013; 8: 2281-2308.